



# UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

---

---

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES  
IZTACALA

## “Análisis de la actividad fotoquímica de *Chlorella vulgaris* expuesta a claritromicina”

T E S I S

PARA OBTENER EL TITULO DE:

B I O L O G O

P R E S E N T A:

**FRANCISCO JAVIER MORALES RIVERA**



DIRECTOR DE TESIS: DR. HUGO VIRGILIO PERALES VELA

TLALNEPANTLA, ESTADO DE MÉXICO, ENERO 2014



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**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.

## **Agradecimientos**

Al Dr. Hugo Virgilio Perales Vela por permitirse su tiempo y esfuerzo en dirigir el presente proyecto de tesis, es para mí un gran honor haber trabajado bajo su tutoría, su enseñanza es invaluable, la cual me ha permitido plantear metas más grandes, gracias por sus consejos y por su dedicación.

A la Dra. Martha Ofelia Salcedo Álvarez por su ferviente apoyo, siempre dispuesta a prestar su apoyo.

Al laboratorio de Bioquímica de la Unidad de Morfología y Función (UMF) de la Facultad de Estudios Superiores Iztacala, Universidad Nacional Autónoma de México, donde se llevó a cabo, el presente proyecto de investigación.

Al Consejo Mexiquense de Ciencia y Tecnología por la beca de titulación otorgada para la culminación del presente proyecto.

A mi madre Natalia Rivera por su insustituible esfuerzo y amor, tú me has demostrado que eres una persona incansable, siempre has luchado por salir adelante y superarse, gracias a ti madre por permitirme conocer esa parte de ti, ese espíritu de lucha que has compartido conmigo, que has sembrado en mí y que nos ha permitido avanzar hasta aquí, como siempre me has dado una lección de vida con tu magna sabiduría, eres sin duda alguna, la mujer que más quiero, la mujer que más admiro, te amo madre querida. Gracias por todo.

A mi familia, María del Rosario, Olga Adriana, Rosa Isela, José Antonio; por permitirse el esfuerzo y la paciencia para poder llegar hasta aquí, les agradezco su apoyo incondicional y sus buenos consejos, hermanos los llevo en mi corazón, están presentes en mi pensamiento, el crecer con ustedes ha sido el mayor placer de toda mi vida y aunque ahora cada quien forme una nueva familia, siempre estaremos unidos, porque este vínculo inquebrantable fue forjado con amor, hermanos Morales Rivera, los amo con toda mi vida.

A mi compañera del alma Ana, quien me ha apoyado incondicionalmente que junto con mi hija Naomi (mi angelito) me han brindado el mejor obsequio de toda la vida, a ustedes tengo un agradecimiento especial que una vida no me bastara para poder retribuírselos, siempre en donde quiera que este los llevo en mi mente y en mi alma, son mi más grande triunfo.

A mis amig@s, compañeros, colegas de la universidad, con quienes he compartido grandes experiencias tanto personales como académicas y profesionales, es un orgullo para mí, tener amistades tan excelsas como lo han sido ustedes, hasta este momento en mi vida solo me queda decir gracias.

<b>ÍNDICE</b>	<b>Página</b>
<b>Resumen</b>	<b>9</b>
<b>I. Introducción</b>	<b>11</b>
<b>II. Antecedentes</b>	<b>14</b>
<b>A. Contaminantes en las aguas residuales.</b>	<b>14</b>
<b>B. Productos farmacéuticos: Definición del problema.</b>	<b>17</b>
<b>C. Cantidad y tipos de fármacos utilizados.</b>	<b>18</b>
<b>D. Fuentes de emisión y contaminación.</b>	<b>20</b>
<b>E. Persistencia de los fármacos en el ambiente acuático.</b>	<b>24</b>
<b>F. Problemática, toxicidad de los fármacos en los organismos</b>	<b>26</b>
<b>G. Impacto de los fármacos en el ambiente acuático y los productores primarios</b>	<b>28</b>
<b>I. Claritromicina:</b>	<b>30</b>
a. Descripción	<b>30</b>
b. Usos	<b>31</b>
c. Actividad biológica	<b>32</b>
d. Regulación	<b>33</b>
<b>III. Justificación</b>	<b>35</b>
<b>IV. Objetivo General</b>	<b>35</b>
<b>V. Objetivos Particulares</b>	<b>35</b>
<b>VI. Metodología</b>	<b>36</b>

1. Organismo	36
2. Medio de cultivo	36
3. Protocolo experimental	36
4. Variables de respuesta	37
a) Determinación de peso seco (Crecimiento)	37
b) Determinación de pigmentos fotosintéticos	37
c) Actividad fotosintética por oximetría (respiración y fotosíntesis)	38
d) Actividad fotosintética por emisión de fluorescencia.	38
I) Análisis de la cinética de fluorescencia por PSII: Prueba OJIP	38
II) Rendimiento cuántico operacional del fotosistema II ( $\Phi$ PSII)	40
e) Análisis estadísticos	41
<b>VII. Resultados y Discusión</b>	<b>42</b>
<b>A. Crecimiento</b>	<b>42</b>
<b>B. Contenido de pigmentos fotosintéticos (clorofila a, b y carotenoides totales)</b>	<b>46</b>
<b>C. Actividad fotosintética: Liberación de oxígeno, transporte electrónico y disipación térmica de energía de excitación.</b>	<b>49</b>
<b>D. Análisis de fluorescencia polifásica de la clorofila a del fotosistema II</b>	<b>56</b>
<b>E. Función del complejo liberador de oxígeno (CLO)</b>	<b>68</b>
<b>F. Estructura y función de los centros de reacción del fotosistema II</b>	<b>71</b>

<b>G.</b>	<b>Actividad y eficiencia cuántica del fotosistema II</b>	<b>82</b>
<b>I.</b>	<b>Actividad y eficiencia cuántica del transporte electrónico en los acarreadores intermedios y los acarreadores del lado aceptor del fotosistema.</b>	<b>87</b>
<b>J.</b>	<b>Índice de rendimiento total.</b>	<b>91</b>
<b>VIII.</b>	<b>Conclusiones</b>	<b>94</b>
<b>IX.</b>	<b>Bibliografía</b>	<b>96</b>
<b>X.</b>	<b>Apéndice</b>	<b>107</b>

<b>ÍNDICE DE FIGURAS</b>		<b>Página</b>
Figura 1.	Fuentes representativas y destino de productos farmacéuticos en el ambiente.	23
Figura 2.	Estructura química de la claritromicina.	31
Figura 3	Efecto inhibitorio de las concentraciones de claritromicina.	42
Figura 4.	Tasa de crecimiento relativo ( $\mu$ ).	44
Figura 5.	Tiempo de duplicación celular.	45
Figura 6.	Porcentaje de inhibición.	46
Figura 7.	Contenido volumétrico de pigmentos fotosintéticos.	48
Figura 8.	Liberación y consumo fotosintético de oxígeno (fotosíntesis y respiración).	50
Figura 9.	Tasa fotosintética máxima en saturación de luz ( $\mu\text{molese}^{-1}\text{m}^{-2}\text{s}^{-1}$ ).	52
Figura 10.	Rendimiento cuántico ( $\alpha$ ).	53
Figura 11.	Disipación No-Fotoquímica (NPQ).	55
Figura 12.	Modelo de absorción y disipación de energía fotónica a través del complejo cosechador de luz (LHCII) y el centro de reacción (RC).	57
Figura 13.	Modelo de cinética de fluorescencia variable (curva de Kautsky) graficado en tiempo logarítmico (O-K-J-I-P).	58
Figura 14.	Cinética de fluorescencia variable (U.R.).	61
Figura 15.	Cinética de emisión de fluorescencia (datos normalizados en $F_0$ ).	62
Figura 16.	Fluorescencia variable relativa “datos mostrados en la tabla 2”).	64
Figura 17:	Efecto de la claritromicina sobre la cinética de emisión de fluorescencia variable relativa $\Delta V_t$ ( $V_t$ experimental– $V_t$ testigo).	66
Figura 18.	Efecto de la claritromicina sobre la cinética de emisión de fluorescencia variable relativa (tratamientos adicionados con metil viológeno).	68
Figura 19.	Efecto de la claritromicina sobre la fracción del complejo liberador de oxígeno activos.	70
Figura 20.	Modelo esquemático de la cadena de transporte electrónico fotosintético incluyendo información sobre la organización estructural de los complejos de proteínas que participan en el transporte de protones y	72



electrones dentro de la membrana tilacoidal.

Figura 21.	Modelo simplificado de flujos de energía en el aparato fotosintético a través del PSII (Prueba O-K-J-I-P).	74
Figura 22.	Efecto de la claritromicina sobre los centros de reacción activos por complejo antena del PSII (Reducción de $Q_A$ por RC por antena).	75
Figura 23.	Flujo de excitones absorbidos por centro de reacción del PSII (ABS/RC).	76
Figura 24.	Flujo de energía atrapada por centro de reacción del PSII ( $TR_0/RC$ ) (máxima tasa de reducción de $Q_A$ ).	78
Figura 25.	Flujo del transporte de electrones por centro de reacción del PSII ( $ET_0/RC$ ).	80
Figura 26.	Flujo de energía disipada por centro de reacción ( $DI_0/RC$ ).	81
Figura 27.	Rendimiento cuántico para la fotoquímica primaria ( $\Phi P_0$ ).	83
Figura 28.	Probabilidad de que un electrón se mueva más allá de $Q_A$ ( $\Psi_0$ ).	85
Figura 29.	Rendimiento cuántico para el transporte de electrones (ET) ( $\Phi E_0$ ).	86
Figura 30.	Flujo específico de transferencia para el transporte de electrones en los acarreadores intermedios y los acarreadores finales del lado aceptor del fotosistema II ( $TR_0RC$ )*(1- $V_i$ ).	87
Figura 31.	Probabilidad con la que un electrón proveniente de los acarreadores intermedios se mueva para reducir los acarreadores finales del lado aceptor del fotosistema II ( $\delta R_0$ ).	88
Figura 32.	Eficiencia cuántica para el transporte de electrónico en los acarreadores intermedios y los acarreadores finales del lado aceptor del fotosistema II ( $\delta R_0$ ).	90
Figura 33.	Índice de Rendimiento ( $PI_{TOTAL}$ ) medidos en <i>C. vulgaris</i> expuesta a claritromicina durante 72 horas. (n=8) (Letras diferentes indican diferencias significativas según la prueba de Tukey $p < 0.05$ ).	92

## ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1.	Parámetros cinéticos de la prueba de OJIP.	39
Tabla 2.	Efecto de las concentraciones de la claritromicina sobre la fluorescencia mínima, máxima, variable y en la fluorescencia variable en las fases J e I y la pendiente inicial de la fluorescencia ( $M_0$ ).	64

## LISTA DE ABREVIATURAS

50s – Subunidad Ribosomal 50s

CE50 – Concentración efectiva media

Chl<sup>a</sup> – Clorofila a

Chl<sup>b</sup> – Clorofila b

CLO – Complejo liberador de oxígeno

EDAR – Estación depuradora de aguas residuales

EDTA – Ácido etildiaminotetraacético

ETR – Transporte electrónico

HRT – Tiempo de retención hidráulica

LHCII – Complejo cosechador de luz del fotosistema II

NPQ – Disipación no fotoquímico

PHAC – Compuestos farmacéuticamente activos

PPCP – Productos farmacéuticos y de cuidado personal

PSI – Fotosistema I

PSII – Fotosistema II

RuBP – Ribulosa 1,5 bifosfato

RCA – Centros de reacción activos

ROS – Especies reactivas de oxígeno

SRT – Tiempo de retención de lodos

WWTP – Plantas tratadoras de aguas residuales

## Resumen.

En la sociedad moderna, actividades tan comunes como la higiene personal o el cuidado a la salud pueden generar serios problemas en el ecosistema, dado que incorporamos a éste una serie de sustancias de diferente origen y naturaleza química, de los cuales se ha estudiado poco respecto de su impacto, algunas sustancias que los investigadores han designado como contaminantes emergentes. Dentro de estos contaminantes están los productos farmacéuticos y sus subproductos (metabolitos).

Actualmente, se reconoce que los compuestos farmacéuticos permanecen activos en los ambientes acuáticos, originados por la disposición de aguas residuales municipales, hospitalarias, industriales, tratadas y no tratadas. Su presencia afecta los procesos biológicos en organismos productores, consumidores y potencialmente, pueden alterar los procesos del ecosistema acuático. Por lo que es esencial evaluar su impacto.

La claritromicina es un antibiótico de amplio uso en la medicina humana y veterinaria, así como en la agricultura y la acuicultura. Este antibiótico es capaz de inhibir la síntesis de proteínas uniéndose a la subunidad ribosomal 50<sub>S</sub> en organismos procariontes. Estudios recientes muestran que también puede unirse a los ribosomas cloroplásticos y mitocondriales.

El objetivo del presente trabajo fue abordar los aspectos relacionados con la presencia de claritromicina en medio acuático, caracterizando la actividad fotoquímica de *Chlorella vulgaris* creciendo en distintas concentraciones de claritromicina.

El alga se cultivó en lotes mediante una combinación de medios minerales Bourrelly-Setlik libre de ácido etilendiaminotetraacético (EDTA). Las unidades experimentales fueron inoculadas con  $4 \times 10^5$  células/L<sup>-1</sup> equivalente a 0.055 de absorbancia a 750 nm, para lo cual se utilizaron células en fase exponencial de cultivos de aproximadamente 72 horas. Las células se mantuvieron en condiciones

de temperatura de 20-25°C, iluminación de 200  $\mu\text{moles}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ , fotoperiodo 14hrs/10 hrs luz/oscuridad y flujo de aire 200  $\text{ml}\cdot\text{m}^{-1}$

Las células se expusieron a las concentraciones de claritromicina: 0 (control), 0.6, 1.2, 1.8, 2.4 y 3.0  $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$  durante 72 horas. Transcurrido el tiempo se cuantificó el peso seco, la cantidad de pigmentos fotosintéticos ( $\text{chl}^a$ ,  $\text{chl}^b$  y carotenoides totales), la actividad metabólica por oximetría y por fluorimetría mediante la emisión de fluorescencia de la clorofila a del fotosistema II (PSII).

Los resultados indican que la claritromicina puede inhibir significativamente el progreso fisiológico incluyendo la actividad fotoquímica primaria, la transferencia de energía de los complejos antena a los centros de reacción, disminuye la actividad de los complejos liberadores de oxígeno y el número de centros de reacción activos, debido a que la claritromicina es un inhibidor de síntesis de proteínas.

## I. Introducción

El agua es un recurso natural escaso, indispensable para la vida humana y el sostenimiento del ambiente, que como consecuencia del rápido desarrollo humano, económico y del uso inadecuado que se ha hecho de ella como medio de eliminación, ha sufrido un alarmante deterioro durante décadas.

Toneladas de sustancias biológicamente activas, sintetizadas para su uso en la agricultura, la acuicultura, la industria y la medicina, han sido vertidas al medio ambiente sin reparar en las posibles consecuencias. El problema de la contaminación, comenzó a hacerse notorio ya a principios del siglo XIX, aunado al problema de la escasez, aspecto que está adquiriendo proporciones alarmantes a causa del cambio climático y la creciente desertificación que está sufriendo el planeta. Los contaminantes son compuestos de distinto origen y naturaleza química cuya presencia en el ambiente, o las posibles consecuencias de la misma, anteriormente han pasado en gran parte inadvertidas (Barceló *et al.*, 2009).

Algunas de las sustancias contaminantes emergentes son los productos farmacéuticos, los productos de cuidado personal, agentes tensioactivos, plastificantes y aditivos industriales. De estos compuestos se sabe poco de su presencia e impacto en los distintos nichos ambientales, en el hombre y que, por tanto, precisan investigación.

Los fármacos son compuestos biológicamente activos (PHAC's, Pharmaceutical Active Compounds por sus siglas en ingles), empleados para restablecer la salud tanto de los seres humanos como de los animales y plantas. Estas sustancias pueden tener efectos parecidos, incluyendo los adversos, ya que existe una amplia diversidad de organismos que comparten muchos receptores y moléculas blanco similares, las cuales se han conservado a través de la evolución, asimismo; se ha visto que estos compuestos pueden producir respuestas inesperadas en microorganismos debido a diferencias farmacocinéticas, farmacodinámicas y fisiológicas (Valdés, 2009).

Los productos farmacéuticos en su forma pura o en forma de metabolitos se introducen continuamente a las aguas de alcantarillado principalmente a través de las excretas, la eliminación de medicamentos no utilizados, caducados, o directamente a los vertederos farmacéuticos. Por otro lado, las aguas residuales que llegan a contener estos productos, pasan por las plantas tratadoras de aguas residuales (WWTP por sus siglas en inglés), donde estos compuestos se mantienen asociados a los lodos residuales, los cuales se generan en las plantas durante el tratamiento; en algunos casos los fármacos no se modifican químicamente por el tratamiento, pudiendo pasar éstos por la planta de tratamiento de aguas residuales sin ser modificados, en cuyo caso terminan en las aguas receptoras.

La eliminación de los productos farmacéuticos en WWTP es variable y dependiendo de las propiedades de la sustancia y los parámetros del proceso, es decir; el tiempo de retención de lodos (TRS), el tiempo de retención hidráulica (TRH) y/o la temperatura (Clara *et al.*, 2005); un gran número de productos farmacéuticos apenas se elimina y, por tanto es detectado en los efluentes de las Estaciones Depuradoras de Agua Residual (EDAR).

Las concentraciones en las que se han encontrado estos fármacos en aguas residuales, aguas superficiales, agua de mar, ríos, lagos e incluso agua para beber en diversos países, éstos podrían parecer insignificantes ya que comúnmente se presentan en  $\text{ng.L}^{-1}$  o  $\mu\text{g.L}^{-1}$  (Corcoran *et al.*, 2010; De Shala y Foster, 2010).

La presencia de productos farmacéuticos en la superficie terrestre y el agua potable está documentada en la literatura (Ternes., 1998; Heberer, 2002; Metcalfe *et al.*, 2003; Giger *et al.*, 2003; Castiglioni *et al.*, 2006; Gros *et al.*, 2007). Aunque se presenten en bajas concentraciones en el ambiente, los fármacos pueden afectar a los organismos acuáticos y terrestres, cuyos efectos adversos dependen del factor de exposición, biodisponibilidad, degradabilidad y la susceptibilidad del

compuesto en cuestión (Barceló *et al.*, 2009). Sin embargo, estos compuestos se utilizan en grandes cantidades, y estudios recientes han indicado que muchos son persistentes en el ambiente, son bioactivos y tienen el potencial de bioacumulación (Brausch y Rand, 2010).

Los fármacos por lo general están dirigidos a moléculas blanco en específico, sin embargo, al ser liberados al ambiente pueden afectar moléculas o rutas metabólicas similares en especies silvestres, teniendo blancos idénticos o similares. Además estas sustancias pueden cumplir un rol fisiológico diferente y los organismos acuáticos pueden ser más sensibles a los efectos de una droga (Christen *et al.*, 2010).

Existe poca información acerca de la toxicidad crónica y la bioacumulación de estas sustancias a través de las cadenas tróficas. Por ejemplo, se sabe que residuos de diclofenaco son los causantes de la reducción en la población de buitre en India y Pakistan (Fent *et al.*, 2006), a su vez el 17 $\alpha$ -etiniloestradiol (estrógeno) induce la feminización en peces incluyendo la inducción del precursor de vitelogenina en machos, formación de un ducto reproductivo femenino en el testis, e inducción de cambio de sexo (Corcoran *et al.*, 2010).

Fármacos como los antibióticos, se aplican específicamente para lidiar contra bacterias patógenas, pero la existencia de fármacos en el ambiente, en donde otros organismos están inevitablemente expuestos, resulta en un riesgo potencial de efectos negativos sobre los microorganismos autóctonos. De igual manera, los productores primarios, como las microalgas y cianobacterias, sobre todo estas últimas, por ser procariontas, pueden ser vulnerables a los antibióticos. Por consiguiente, los antibióticos pueden afectar tanto a los productores primarios de la cadena trófica, así como a los descomponedores, efectos que puedan perturbar en gran medida los procesos de los ecosistemas (Van der Grinten, 2010). Por lo anterior es esencial vigilar y evaluar el impacto de los antibióticos en los ecosistemas acuáticos.

La claritromicina (6-O-metil eritromicina A) es un antibiótico macrólido semisintético derivado de la eritromicina A. El mecanismo de acción consiste en inhibir la síntesis de proteínas bacterianas mediante la unión a la subunidad 50S ribosomal bacteriana. La unión del antibiótico inhibe la actividad peptidil transferasa e interfiere con la translocación de aminoácidos durante el proceso de traducción y ensamblaje de proteínas. El efecto de la claritromicina puede ser bacteriostático o bactericida dependiendo del organismo y de la concentración del fármaco.

Por lo anterior, el presente trabajo tuvo como objetivo evaluar los efectos de la claritromicina sobre la actividad fotosintética, pues surge la necesidad de realizar estudios toxicológicos en grupos como las algas, dado que estos organismos autotróficos son un excelente modelo, debido a que forman parte del primer eslabón en la cadena trófica y constituyen una fracción importante de los principales productores primarios, los ensayos con estos organismos pueden proveer información importante para promover el manejo y uso adecuado de diversos fármacos.

## **II. Antecedentes**

### **A. Contaminantes de las aguas residuales**

El 59% del consumo total del agua en los países desarrollados se destina a uso industrial, el 30% a consumo agrícola y un 11% a gasto doméstico, según se constata en el primer informe de Naciones Unidas sobre el desarrollo de los recursos hídricos del mundo. El sector primario no solo es el que más gasta sino el que más contamina, más de un 80% de los desechos peligrosos del mundo se producen en los países industrializados, mientras que en las naciones en vías de desarrollo un 70% de los residuos que se generan en las fábricas se vierten al agua sin ningún tipo de tratamiento previo, contaminando así a los recursos hídricos disponibles (Rodríguez *et al.*, 2006).



En la actualidad una de las problemáticas más graves que afrontan las ciudades de México es el problema de la contaminación ambiental en diferentes aspectos: aire, tierra y agua; siendo este último recurso el de mayor importancia y el que requiere especial atención ya que en la República Mexicana el 80% del agua se encuentra a menos de 500 msnm, mientras que solo el 5% está arriba de la cota de los 2,000 msnm, por lo que se dificulta el suministro hasta la ciudad.

El crecimiento de la actividad industrial, así como la elevada demanda por parte de la población, han generado serias alteraciones ecológicas, ya que la descarga de aguas residuales de diferentes orígenes (industrial, doméstico, agrícola, etc.) a los cuerpos de aguas naturales, se lleva a cabo sin ningún tipo de tratamiento, lo cual ha traído como consecuencia la contaminación de prácticamente todas las cuencas hidrológicas que sirven de abastecimiento a los centros urbanos (Salazar, 2009).

Los productos farmacéuticos en el ambiente se originan a partir de prácticas industriales, agrícolas, médicas y domésticas, son tan solo una pequeña parte de los contaminantes de uso cotidiano que logran llegar al ambiente a través de los excrementos humanos y animales, cuando estos se desechan al alcantarillado, estos se dirigen a cuerpos de agua como ríos y lagos, que inclusive pueden llegar al mar. Estos contaminantes no son regulados por la legislación mexicana, y las depuradoras de agua residual no realizan su análisis de forma rutinaria (Colón, 2010).

Los residuos de productos farmacéuticos en las aguas superficiales y agua potable han aumentado enormemente en los últimos tiempos. Mayor cantidad de productos farmacéuticos son frecuentemente detectados en los ríos, arroyos, efluentes de aguas residuales, aguas superficiales y aguas subterráneas e incluso en el agua potable (Kar y Roy, 2010). Varias investigaciones han mostrado que las sustancias de origen farmacéutica a menudo no se eliminan durante el tratamiento de aguas residuales y de igual manera, una buena parte de compuestos

farmacéuticos indican que también no son biodegradables en el ambiente (Ternes, 1998; Heberer, 2002).

Por otro lado, en términos de las aguas residuales, en México se generan alrededor de 13.5 km<sup>3</sup>/año, de estas las municipales generan 7.49 km<sup>3</sup>/año (237.5 m<sup>3</sup>/s) y las no municipales (incluyendo a la industria) generan 6.01 km<sup>3</sup>/año (190.4 m<sup>3</sup>/s). Sólo un total de 3.94 km<sup>3</sup>/año de aguas residuales son tratadas, correspondientes a 2.78 km<sup>3</sup>/año (88.1 m<sup>3</sup>/s) de aguas municipales y 1.16 km<sup>3</sup>/año (36.7 m<sup>3</sup>/s) de no municipales (CONAGUA, 2011).

En nuestro país, el 17 % de las aguas residuales producidas son tratadas, de las cuales solamente el 9.25 % alcanzó las eficiencias esperadas, utilizándose para ello procesos sofisticados con equipo de alto costo, lo cual representa una gran limitante en su aplicación por el aspecto económico y por las bajas eficiencias logradas (Salazar, 2009).

Ante el volumen creciente de agua residual generada en México, de la cual más del 50 % no recibe algún tipo de tratamiento antes de ser vertida a aguas y bienes nacionales y la naturaleza cada vez más compleja de los contaminantes químicos y biológicos que ésta contiene, es necesario desarrollar evaluaciones periódicas de bajo costo de operación y mantenimiento para incrementar la cantidad del agua residual tratada, reducir el impacto de contaminación de compuestos a distintos compartimientos ambientales y obtener una alta calidad de los efluentes.

Una tarea emergente para las plantas municipales de tratamiento de aguas residuales sería la de actuar como una barrera para los contaminantes, evitando la emisión de sustancias potencialmente perjudiciales en el ambiente. Por tanto el destino de contaminantes durante el tratamiento de las aguas residuales y los mecanismos pertinentes para su eliminación, deben ser entendidos (Joss *et al.*, 2006).

## **B. Productos farmacéuticos: Definición del problema**

Un grupo muy amplio de productos químicos, que comparativamente reciben menos atención como potenciales contaminantes del ambiente, es el que incluye a los productos farmacéuticos y compuestos activos de los productos de cuidado personal (PPCPs, Pharmaceutical and personal care products). (Kolpin *et al.*, 2002; Richardson, 2007; Hijosa-Valsero *et al.*, 2010)

Los PPCP, incluyendo fármacos, agentes de diagnóstico, cosméticos, fragancias, suplementos nutricionales y aditivos utilizados en muchos productos de limpieza del hogar, son una clase de contaminante químico emergente que se han usado ampliamente durante décadas. Desde finales de 1990, la detección de PPCP en matrices ambientales ha sido cada vez más informado en todo el mundo (Wu *et al.*, 2010), varios de estos productos, han sido encontrados y caracterizados por persistir en el ambiente, ya que presentan una actividad perjudicial como bioacumulables.

Los productos farmacéuticos son sustancias biológicamente activas diseñadas para dañar organismos como bacterias, hongos, y protozoos (parásitos) (Jjemba, 2002); afectando las funciones bioquímicas y fisiológicas de estos organismos, después de la aplicación, muchos de estos compuestos y/o sus metabolitos se eliminan del cuerpo principalmente a través del sistema renal (orina), el sistema biliar (heces), o una combinación de ambos, dependiendo de la naturaleza del compuesto y el organismo en cuestión (Jjemba, 2006).

Según las propiedades fisicoquímicas de los fármacos, sus metabolitos y sus productos de degradación, pueden llegar a través de sistemas de aguas residuales, de vertederos industriales, efluentes de las plantas de tratamiento de aguas residuales, acuicultura y ganadería (Bottoni *et al.*, 2010); y alcanzar las aguas subterráneas para contaminar los acuíferos o bien quedar retenidas en el suelo y acumularse pudiendo afectar al ecosistema y a los humanos principalmente a través de la cadena trófica (Barceló y López, 2008).

Existen preocupaciones toxicológicas relativas a la liberación al ambiente de PPCP incluyendo la inducción de procesos fisiológicos anormales y la alteración de la reproducción, el aumento de la incidencia de cáncer, el desarrollo de bacterias resistentes a antibióticos, y el potencial para el aumento de toxicidad cuando se producen mezclas de productos químicos en el ambiente (Richardson *et al.*, 2005).

Asimismo, la evidencia experimental indica que los fármacos pueden causar efectos dañinos, como las alteraciones morfológicas, metabólicas y del sexo en especies acuáticas, la inducción de resistencia a los antibióticos en los microorganismos patógenos acuáticos y la interrupción de las actividades de biodegradación en plantas tratadoras de aguas residuales (Bottoni *et al.*, 2010).

### **C. Cantidad y tipos de fármacos utilizados.**

Entre los fármacos más prescritos en medicina humana destacan los analgésicos, antiinflamatorios como el ibuprofeno y el diclofenaco, los antiepilépticos como la carbamacepina, antibióticos como la amoxicilina y el sulfametoxazol, y los  $\beta$ -bloqueadores como el metoprolol (Barceló *et al.*, 2008). A éstos cabe añadir los, cada vez más utilizados en la veterinaria, en actividades como la agricultura, acuicultura, la ganadería, y la avicultura; dentro de los fármacos aprobados, los antibióticos se encuentran dentro de los más ampliamente utilizados (Lai *et al.*, 2009).

Se estima, que el consumo mundial de fármacos producidos y utilizados por los seres humanos se considera en 100,000 o más toneladas métricas por año (Kümmerer, 2009). Cerca de 3,000 sustancias diferentes se utilizan en la medicina en la Unión Europea (Li y Randak, 2009). Mientras que en los Estados Unidos aproximadamente 23,000 toneladas de antibióticos son usados en total por año. (Ternes y Joss, 2006).

En la Unión Europea 4,700 toneladas de antibióticos fueron administrados en animales de granja y 8,500 toneladas en humanos (Liu *et al.*, 2011a). Alrededor de 10,000 toneladas de antibióticos se consumen cada año para fines veterinarios (FEDESA the European Animal Health Association, 1999). De acuerdo con estos datos 5,000 toneladas se deben a efectos veterinarios (3,500 toneladas de profilaxis y terapia, y la promoción del crecimiento alrededor de 1,500 toneladas), la otra mitad de producción es utilizada en medicina. Entre los antibióticos que se utilizan en la práctica veterinaria (también se aplica en la acuicultura), las penicilina, tetraciclinas y macrólidos son los más frecuentemente administrados, mientras que en los seres humanos fluoroquinolonas, macrólidos y aminoglucósidos son los más continuamente utilizados (Estévez *et al.*, 2005).

En Alemania, el número de productos farmacéuticos es estimado alrededor de 3,000 y puede alcanzar los 4,000 compuestos contando los utilizados en la medicina veterinaria (Mompelat *et al.*, 2009). Aproximadamente 50,000 fármacos fueron registrados en Alemania para uso humano, de los cuales 2,700 son responsables del 90% de consumo total y a su vez contienen alrededor de 900 sustancias activas diferentes (Estévez *et al.*, 2005). En general, Alemania produce cerca de 900 toneladas de penicilina por año (Hirsch *et al.*, 1999); mientras que en Dinamarca se utilizan anualmente más de 200 toneladas de agentes antibacterianos para fines humanos y veterinarios (Halling-Sørensen, 2000), este país produce aproximadamente 87 toneladas de antibióticos por año (Halling-Sørensen *et al.*, 1998).

En China, se estima que el consumo anual de materias primas de antibióticos es de aproximadamente 180,000 toneladas (incluida la salud y el uso agrícola). Esto significa que cada persona consume 138 g de antibióticos cada año, que es diez veces más alto que en Estados Unidos (incluyendo el uso medicinal y el de acuicultura) (Zeng *et al.*, 2012).

En el 2003, China era el mayor fabricante de productos farmacéuticos en el mundo, con una producción anual de 28,000 toneladas de penicilina (60% del total mundial), 10,000 toneladas de terramicina (65% del total mundial), y ocupa el primer lugar entre naciones para el clorhidrato de doxiciclina (una especie de tetraciclina) y las cefalosporinas (Zeng *et al.*, 2012).

Por otra parte, la cantidad total de ácido acetil salicílico vendido por año se ha estimado en más de 500 toneladas. Sin embargo, otros analgésicos tales como el diclofenaco o el ibuprofeno son vendidos en cantidades anuales que son aproximadamente de 75 y 180 toneladas respectivamente (Ternes, 1998; Hereber, 2002).

#### **D. Fuentes de emisión y contaminación**

Las principales fuentes de contaminación farmacéutica están representadas por aguas residuales domésticas, urbanas, hospitalarias, e industriales, así como por los efluentes de las plantas de tratamiento de aguas residuales, acuicultura y ganadería intensiva (Bottoni, 2010).

Los hospitales son una de las principales fuentes de compuestos farmacéuticos resultado de las actividades de diagnóstico, de laboratorio, de tratamiento o de investigación; una gran variedad de contaminantes que incluyen principios activos de fármacos y sus metabolitos, productos químicos, metales pesados, desinfectantes y esterilizantes, detergentes específicos para algunos instrumentos, marcadores radioactivos y medios de contraste yodados, por mencionar algunos ejemplos (Verlicchi *et al.*, 2010). Algunos elementos como los compuestos de diagnóstico; tales como medios de contraste de rayos X, formulaciones o medicamentos no utilizados (y/o caducos) se vierten directamente en sus formas nativas a través del alcantarillado o por medio del recogido de residuos sólidos, los cuales son llevados a los depósitos o vertederos en los que aparecen como contaminantes de ecosistemas terrestres (Santos *et al.*, 2010).

Durante y después del tratamiento humanos y animales excretan una combinación de farmacéuticos metabolizados e intactos, muchos de estos compuestos, sus metabolitos y/o sus conjugados se eliminan como una mezcla de sustancias del organismo a través de sistemas excretores, dependiendo de la naturaleza del compuesto, los cuales presentan normalmente actividad farmacológica significativa (Jjemba, 2006; Kar y Roy, 2010), varios de estos productos son generalmente solubles en agua y han sido descargados a los ambientes terrestres y acuáticos de forma directa e indirecta (Shala y Foster, 2010).

De igual manera, se introducen los medicamentos veterinarios utilizados para el tratamiento y la prevención de enfermedades, estos compuestos y sus metabolitos son propensos a contaminar el suelo y las aguas subterráneas; en la agricultura se internan deliberadamente en el ambiente cuando el estiércol líquido se pulveriza en el campo agrícola. Por otra parte, no puede excluirse que los PPCP presentes en los biólodos aplicados a campos de cultivo puedan ser absorbidos por las plantas. El transporte de los medicamentos veterinarios a las aguas subterráneas puede ser a través de lixiviación o escorrentía de las lechadas de ganado, mientras que la absorción del fármaco en el suelo puede retrasar su distribución (la Farré *et al.*, 2008).

Se considera que otra de las principales fuentes de contaminación por fármacos son las descargas de aguas no tratadas y los efluentes de las plantas de tratamiento de aguas residuales. En la actualidad las plantas de tratamiento no están diseñadas para tratar y eliminar productos y subproductos farmacéuticos, por lo que dichos compuestos pueden llegar finalmente al ambiente acuático.

Por ejemplo, las plantas de tratamiento de aguas residuales o estaciones depuradoras públicas (EDAR) reciben influentes procedentes de usos domésticos, municipales, e industriales (incluyendo las industrias farmacéuticas). Los efluentes ya procesados con tratamientos primarios y secundarios son descargados a las aguas superficiales y estas pueden ser utilizadas para la agricultura y acuicultura;

en muchas ocasiones, derivado del tratamiento de aguas residuales pueden obtenerse biosólidos o lodos, los cuales en conjunto con el estiércol son aplicados a tierras de cultivo, para mejorar las deficiencias de nutrientes en las mismas (Jjemba, 2002) e incluso en ocasiones también se suelen utilizar aguas residuales crudas o tratadas (Corcoran *et al.*, 2010; Shala y Foster, 2010). Cabe mencionar que la aplicación del estiércol es utilizado en la acuicultura de manera significativa (Christen *et al.*, 2010).

En resumen, la mayoría de PPCP's introducidos en el ambiente van a parar a los sistemas acuáticos, mientras que el medio terrestre recibe una entrada secundaria. La presencia y concentración de fármacos en el ambiente depende en gran parte de los volúmenes de producción y de los hábitos de consumo. De esta forma, estos compuestos conforman un ciclo, constituido por administración, excreción, plantas municipales depuradoras, aguas superficiales, recarga en aguas subterráneas y de vuelta a los humanos y actividades antropogénicas a través del agua potable.

Por lo tanto, el conocimiento de las propiedades toxicológicas de los productos farmacéuticos, las fuentes de emisión y el destino, su comportamiento ambiental y el impacto sobre los organismos, se ha convertido recientemente en un tema de interés para muchos investigadores. El análisis de los contaminantes como los compuestos farmacéuticos es un reto analítico real, no solo a causa de la diversidad de las propiedades químicas de estos compuestos, sino también por lo general bajas concentraciones, el uso masivo en actividades antropogénicas, el vertimiento continuo al ambiente, y la complejidad de afectación en las matrices ambientales.

Teniendo en cuenta lo largo de toda su trayectoria, desde su fuente de emisión, hasta su transformación, su acumulación y finalmente, los posibles efectos en los compartimientos ambientales y sistemas vivos (como puede observarse en la figura 1); son las bases para identificar los peligros potenciales de una sustancia para el ambiente acuático, pudiendo así analizar a aquellos disturbios que se



encuentren en niveles tróficos superiores así como a sus dinámicas poblacionales; lo cual nos permitirá implementar medidas de análisis, mitigación y remoción de estos elementos contaminantes en cada nivel de los compartimientos ambientales.

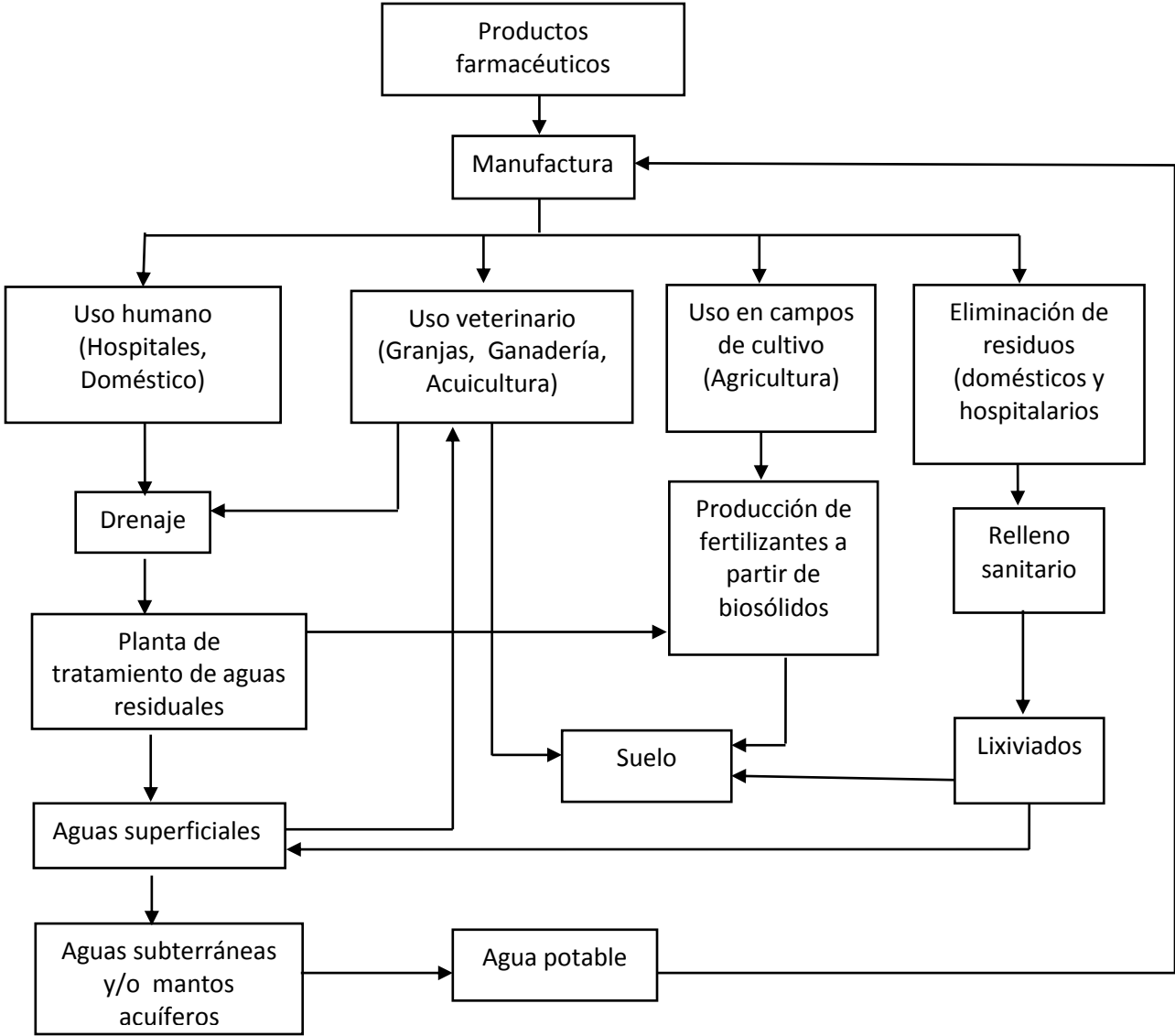


Figura 1. Fuentes representativas y destino de productos farmacéuticos en el ambiente. (Modificado de Gómez, 2012)

## **E. Persistencia de los fármacos en el ambiente acuático**

La eliminación de compuestos farmacéuticos en el ambiente puede ser el resultado de diferentes procesos. Estos procesos pueden ser los bióticos, es decir biodegradación por microorganismos como bacterias y hongos. Mientras que los procesos de eliminación abióticos son sorción, hidrólisis, fotólisis, oxidación y reducción (Kümmerer, 2009). Si una sustancia no se elimina en modo alguno, puede alcanzar el ambiente con el potencial de afectar negativamente a los organismos acuáticos y terrestres, además podría llegar a los seres humanos de nuevo a través de los residuos que alcancen los cuerpos de agua potable o inclusive las tramas de redes tróficas.

Hasta ahora y por fortuna, los antibióticos todavía no se han reportado estar presentes en el agua potable. Sin embargo, la alta solubilidad y la baja volatilidad de PPCP significan que su distribución a través del entorno se producirá principalmente a través del transporte y la dispersión acuosa de la cadena alimentaria (Daughton y Ternes 1999).

A pesar de los diversos tratamientos de eliminación de contaminantes en las plantas tratadoras de aguas residuales, se han detectado fármacos en el ambiente acuático, ya sea directamente o sus metabolitos, dentro de estos compuestos se incluyen los analgésicos-antiinflamatorios, los antibióticos, los antiepilépticos, los  $\beta$ -bloqueadores, los reguladores de lípidos, los medios de contraste en rayos X, los anticonceptivos orales, los esteroides y otros, como broncodilatadores, tranquilizantes, entre otros. (Hernando *et al.*, 2006).

Muchos de estos compuestos pueden mantenerse activos si no fueron eliminados en plantas de tratamiento, donde el nivel de degradación no solo depende del grado de tratamiento del agua, sino también de la estructura química del compuesto (Shala y Foster, 2010). Si los fármacos y sus metabolitos son susceptibles de pasar a través de las plantas tratadoras de aguas residuales,

podrán entrar a los cuerpos de agua como ríos o arroyos. Estos pueden alcanzar las aguas subterráneas después de la lixiviación (la Farré *et al.*, 2008).

Recientemente, varios estudios se han llevado a cabo para detectar las concentraciones de los fármacos en los cuerpos de aguas residuales, en la superficie, tierra y agua potable. Por ejemplo, se han encontrado macrólidos, sulfamidas y quinolonas en concentraciones de  $\mu\text{g.L}^{-1}$  en las aguas residuales de muestras de agua superficial en Alemania y Suecia. Estos investigadores observaron la frecuente aparición de eritromicina, roxitromicina y sulfametoxazol con concentraciones superiores a  $6.0 \mu\text{g.L}^{-1}$  en los efluentes de plantas tratadoras de aguas residuales (Hirsch *et al.*, 1999; Andreozzi *et al.*, 2003; Lange *et al.*, 2006; Castiglioni *et al.*, 2004; Calamari *et al.*, 2003); lincomicina, eritromicina y claritromicina estaban presentes en todo el muestreo de sitios en los ríos Po y Lambro, sobre el norte de Italia en concentraciones entre 10 y  $100 \text{ ng.L}^{-1}$  (Isidori *et al.*, 2005).

Por otra parte, las concentraciones a las que se han encontrado en aguas superficiales (como consecuencia de una eliminación incompleta en las plantas de depuración de aguas) o en aguas subterráneas se sitúan normalmente en el intervalo de  $\text{ng.L}^{-1}$  o  $\mu\text{g.L}^{-1}$ , mientras que en suelos y sedimentos, en donde pueden persistir durante largos periodos de tiempo, alcanzan concentraciones de hasta  $\text{g.Kg}^{-1}$  (Barceló y López, 2008).

Algunos de los fármacos encontrados mayormente en ríos son beta-bloqueadores (Metoprolol hasta  $1.54 \mu\text{g.L}^{-1}$ ), analgésicos y antiinflamatorios (Diclofenaco hasta  $1.2 \mu\text{g.L}^{-1}$ ), estrógenos ( $17\beta$ -estradiol hasta  $0.013 \mu\text{g.L}^{-1}$ ) y algunos antibióticos (Eritromicina hasta  $1.7 \mu\text{g.L}^{-1}$ ), así como algunos fármacos antiepilépticos. (Supratik y Kunal, 2010); en Alemania se han encontrado concentraciones medias de diclofenaco entre 3.02 y  $2.51 \mu\text{g.L}^{-1}$ , detectadas en los influentes y efluentes de plantas tratadoras de aguas residuales, respectivamente (Halling-Sorensen, 2000).

En Europa, 21 antibióticos incluyendo un  $\beta$ -lactámico, 3 sulfonamidas, 4 quinolonas, 1 tetraciclina, 5 macrólidos, se han encontrado en las aguas residuales de 10 países (Italia, Alemania, Croacia, Suiza, Suecia, Austria, España, Reino Unido, Finlandia y Portugal) (Li *et al.*, 2011). Debido a su biodisponibilidad, biodegradación y su variada actividad biológica en los compartimientos ambientales, existe un riesgo de bioacumulación y efectos de la exposición crónica de los productos farmacéuticos en los organismos.

## **F. Problemática, toxicidad de los fármacos en los organismos**

La presencia y el destino de los compuestos farmacéuticos activos en el ambiente acuático constituyen uno de los eventos emergentes en la contaminación química ambiental, los cuales pueden generar efectos tóxicos crónicos en el ambiente. En muchos casos, las consecuencias de su presencia en el ambiente aún no están claras, pero en otros el riesgo parece evidente y alarmante.

Las pruebas actuales de toxicidad aguda-crónica utilizadas para la detección de toxicidad sólo proporcionan indicios de los efectos agudos directamente medibles; aunque muchos organismos no comparten ciertos receptores contra los fármacos, los efectos sobre los organismos no objetivo son generalmente desconocidos; ya que, los efectos toxicológicos de los medicamentos en los diferentes niveles de la jerarquía biológica, desde las bacterias a toda la biosfera, no se han estudiado (Isidori *et al.*, 2005).

Debido a las propiedades fisicoquímicas de los fármacos, sus metabolitos, productos de degradación, y las características de los suelos, estas sustancias pueden llegar a alcanzar las aguas subterráneas y contaminar los acuíferos o bien quedar retenidas en el suelo y acumularse pudiendo afectar al ecosistema y a los organismos a través de la cadena trófica (Barceló *et al.*, 2008).

Por ende, existen preocupaciones toxicológicas relativas a la liberación al ambiente de PPCP, los cuales originan la inducción de procesos fisiológicos anormales, alteraciones reproductivas, el desarrollo de bacterias resistentes a los antibióticos; asimismo, del potencial aumento de la toxicidad cuando se producen mezclas químicas en el ambiente que afectan distintos niveles en los distintos compartimientos ambientales de los ecosistemas.

Para muchos PPCP, los posibles efectos sobre los seres humanos y el ambiente acuático no se entienden claramente. La principal razón de esto radica en la capacidad de análisis para detectar PPCP sobre el ambiente: en la actualidad, existe una falta de protocolos adecuados para la identificación y medición de PPCP sin el uso de métodos tecnológicos muy caros. (Richardson *et al.*, 2005)

La toxicidad aguda de los productos farmacéuticos ha sido evaluada por las pruebas estándar de acuerdo a las directrices establecidas sobre la base de las bacterias, algas, invertebrados y peces (la Farré *et al.*, 2008). Sin embargo el no conocer el modo de acción, junto con no saber los receptores posibles, es imposible diseñar procedimientos de ensayo de toxicidad racionales en el nivel de organismo (Daughton y Ternes, 1999).

Los datos ecotoxicológicos disponibles sólo para unos pocos productos farmacéuticos se encuentran en la literatura abierta y bases de datos ecotoxicológicas como: ECETOX en la Unión Europea y ECOTOX en los Estados Unidos de Norteamérica, (Sanderson, 2003) y sólo un pequeño número de nuevos fármacos han sido sometidos a un evaluación de riesgos completa, incluyendo una serie de pruebas toxicológicas pertinentes (Kar and Roy, 2010).

Por otra parte, los nuevos datos sobre las fuentes, el destino y los efectos de los productos farmacéuticos en el ambiente, parece indicar la posibilidad de un impacto negativo en los diferentes ecosistemas e implican una amenaza para la salud pública. Para este supuesto, los datos de pruebas de ecotoxicidad agudas y

crónicas en las especies que pertenecen a diferentes niveles tróficos tales como bacterias, algas, crustáceos y peces, entre otros, es relevante para ilustrar los varios efectos adversos que la exposición del ambiente a las mediciones de estos contaminantes y los impactos que puede tener (Santos *et al.*, 2010).

## **G. Impacto de los fármacos en el ambiente acuático y los productores primarios**

Aunque la mayoría de los medicamentos están diseñados para tratar las vías metabólicas específicas en los seres humanos y los animales domésticos, estos pueden tener numerosos efectos, a menudo desconocidos en los sistemas metabólicos de los organismos no objetivos, especialmente en los invertebrados (Daughton y Ternes, 1999); por lo que sus residuos metabólicos y productos de degradación en el ambiente pueden causar diferentes efectos ecotoxicológicos que son difíciles de predecir, especialmente en matrices complejas. Un aspecto importante de este problema es la transformación y el destino de estos materiales en sistemas biológicos y ecológicos. Por ejemplo, muchos de los productos farmacéuticos más ampliamente utilizados son solubles y sujetos a la degradación o metabolismo que conduce a la formación de sus formas de ácido carboxílico y persistentes (la Farré *et al.*, 2008).

La evaluación de los efectos sobre los ecosistemas acuáticos es una tarea importante, ya que estos sistemas son los sitios más afectados tras el vertido continuo de pesadas cargas de contaminantes ambientales (Nunez *et al.*, 2005); existe la posibilidad de efectos continuos pero inadvertidos en los organismos acuáticos lo cual es especialmente preocupante porque los efectos pueden acumularse tan lentamente que grandes cambios no se detectan hasta que el nivel acumulativo de estos efectos sea evidente.

Las principales investigaciones sobre toxicidad crónica en organismos se han realizado en crustáceos, peces y algunas especies de algas. Pocas de las pruebas realizadas sobre algas, mostró que algunas especies de microalgas especialmente

las cianobacterias son sensibles a compuestos farmacéuticos (Halling-Sorensen, 2000). Los estudios recientes han mostrado que varias tetraciclinas afectan el crecimiento de clorofíceas en el ambiente acuático (Yang *et al.*, 2013).

Aunque se sabe definitivamente que los organismos blanco de los antibióticos son las bacterias en lugar de algas eucariotas, varios antibióticos todavía pueden tener efectos nocivos para las algas, sobre todo en los orgánulos de las algas como cloroplastos y mitocondrias al poseer similitud a las bacterias en las estructuras e incluso origen evolutivo. Explicando que los posibles efectos ambientales sobre los organismos no blanco, han atraído cada vez más atención, sobre todo a los productores primarios en los ecosistemas acuáticos.

Las algas como productores primarios de ecosistemas acuáticos, juegan un papel importante en la estructura y función de todo el sistema ecológico acuático. Dado que las microalgas constituyen la base de la cadena alimentaria en los ecosistemas acuáticos, las alteraciones de estos organismos fotoautótrofos (los cuales ocupan los niveles tróficos más bajos dentro de las cadenas alimentarias y los cambios en su diversidad y abundancia) pueden provocar un efecto indirecto pero significativo en el resto de la comunidad. Por lo tanto, las microalgas se utilizan a menudo como indicadores para la contaminación xenobiótica y la calidad del agua (Liu *et al.*, 2011b). En este contexto, se utilizan generalmente en la evaluación de la toxicidad del ambiente (Pan *et al.*, 2009).

Las microalgas son la fuente de alimentación de una gran cantidad de biomasa acuática, estos organismos tienen una importancia fundamental en la producción y el equilibrio de oxígeno disuelto en un ambiente acuático (Lai, 2009). Algunas microalgas son muy sensibles a la contaminación de los medios acuáticos (Eguchi *et al.*, 2004). Los estudios sobre los efectos tóxicos de antibióticos en ambientes acuáticos se ha demostrado que la  $CE_{50}$  (72 h) de *Selenastrum capricornutum* es  $2.97 \text{ mg.L}^{-1}$  para la ciprofloxacina,  $7.8 \text{ mg.L}^{-1}$  para sulfadiazina, y  $2.3 \text{ mg.L}^{-1}$  para espiramicina (Holten Ltzhøft *et al.*, 1999; Halling-Sørensen, 2000).

## I. Claritromicina

### a. Descripción

Los macrólidos son moléculas cuya estructura química está constituida por un anillo lactónico de gran tamaño. Estas moléculas de amplio espectro antimicrobiano, dentro de los cuales se encuentra la claritromicina, cuyo mecanismo de acción al igual que el resto de los macrólidos, se une de forma reversible al dominio V del ARN ribosómico 23<sub>S</sub> de la subunidad 50<sub>S</sub>, inhibiendo de esta forma la síntesis proteica al bloquear la elongación de las proteínas. La unión se realiza mediante la formación de puentes de hidrogeno entre diferentes radicales hidroxilo del macrólidos y determinadas bases del ARNr, y por la unión débil entre la cladinosa y el dominio II del ARNr 23<sub>S</sub> (Paciel y Savio, 2010; Lange *et al.*, 2006).

En el caso particular, la claritromicina es un macrólido semisintético derivado de la eritromicina A y consiste de un anillo de lactona de 14 miembros, así como cladinosa y residuos de desosamina en las posiciones 3 y 5 del anillo (Kanfer *et al.*, 1998). Este antibiótico se obtiene por la sustitución del grupo hidroxilo de la posición 6 por un grupo CH<sub>3</sub>O en el anillo lactónico de la eritromicina. La claritromicina es específicamente 6-O-metil eritromicina A. Es un polvo blanco, amargo, prácticamente inodoro, es esencialmente insoluble en agua y ligeramente soluble en etanol, metanol, y acetonitrilo. Su peso molecular es 747,96. Este fármaco ejerce su acción antibacteriana mediante la unión a las subunidades ribosomales 50<sub>S</sub> de las bacterias susceptibles y la inhibición de la síntesis proteica.



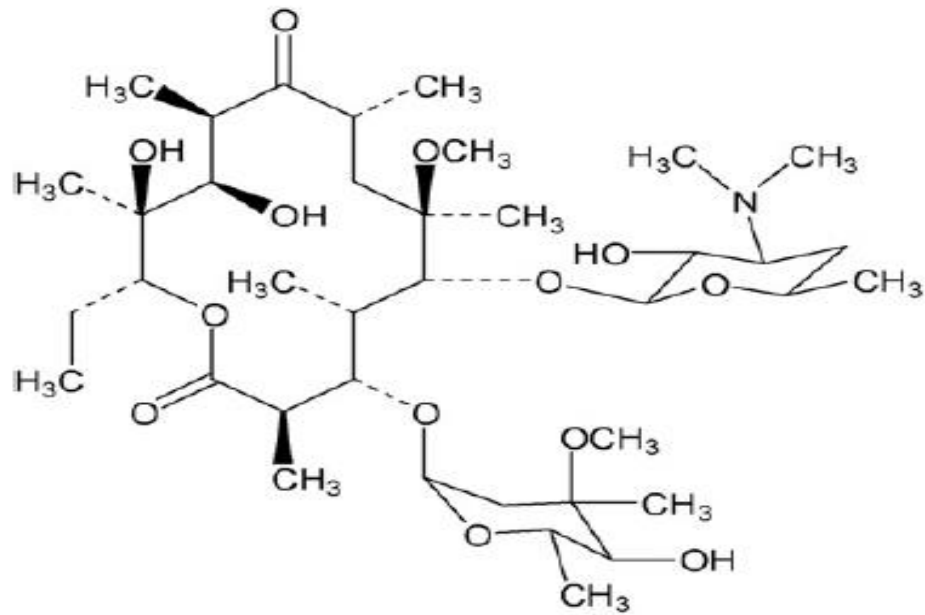


Figura 2. Estructura química de la claritromicina.

## b. Usos

La claritromicina se utiliza para tratar ciertas infecciones bacterianas, tales como neumonía (infección pulmonar), bronquitis (infección de los conductos que van hacia los pulmones), e infecciones de los oídos, senos nasales, la piel y garganta. También se utiliza para tratar y prevenir la infección *Mycobacterium avium* complex (MAC) [un tipo de infección pulmonar que afecta con frecuencia a personas con el virus de inmunodeficiencia humana (VIH)]. Se combina con otros medicamentos para eliminar *H. pylori*, una bacteria la cual provoca úlceras.

El uso de los diversos antibióticos macrólidos depende en gran medida del país. Por ejemplo, el consumo de la eritromicina es alta en el Reino Unido (cerca de 1200 mg por persona por año) y baja en Suiza (24 mg por persona por año) (McArdell *et al.*, 2003). Por otro lado, el uso de la claritromicina es baja en Alemania (cerca de 20 mg por persona por año) y más de diez veces mayor en Suiza, Austria y Francia (para el Reino Unido, los datos parecen no estar disponibles). El importe total de los antibióticos macrólidos prescritas en 1995 en Alemania se ha estimado en 8.3 a 28.6 toneladas por año (Hirsch *et al.*, 1999).

### c. Actividad biológica

La claritromicina es metabolizada a 14-OH claritromicina, el cual está activo y funciona sinérgicamente con su compuesto de origen. Al igual que otros macrólidos, penetra la pared celular de las bacterias donde se une reversiblemente al dominio V del ARNr 23s de la subunidad 50s del ribosoma bacteriano, bloqueando la translocación de transferencia aminoacil-ARN y la síntesis de polipéptidos (Wishart, 2012); por lo tanto, macrólidos tales como la eritromicina, azitromicina y claritromicina podrían inducir directamente la inhibición de muchas proteínas funcionales codificadas por los genes de los cloroplastos y la interferencia con muchos procesos fisiológicos, incluyendo la biosíntesis de clorofila y la fotosíntesis (Liu *et al.*, 2011b).

El espectro de actividad de la claritromicina incluye en muchas bacterias aerobias gram-positivas (*Staphylococcus aureus*, *S. pneumoniae* y *S. pyogenes*) y gram-negativas (*Haemophilus influenzae*, *H. parainfluenzae* y *Moraxella catarrhalis*), muchas de las bacterias anaerobias, algunas micobacterias, y algunos otros organismos como *Ureaplasma*, *Mycoplasma*, *Chlamydia*, *Toxoplasma* y *Borrelia*. En otras bacterias aerobias que la claritromicina tiene actividad pueden ser *Chlamydomonas pneumoniae* y *Mycoplasma pneumoniae*. La actividad in vitro de este antibiótico es similar o mayor que la de la eritromicina contra organismos susceptibles (Wishart, 2012).

Los efectos de los antibióticos macrólidos en la biosíntesis de la clorofila *a* y la fotosíntesis de algas verdes es desconocido. Se requieren estudios adicionales para comprender cómo estas microalgas de importancia ecológica responden fisiológicamente a un aumento de las concentraciones de antibióticos sobre la columna de agua, en especial a la exposición de los antibióticos ampliamente utilizados que actúan como inhibidores de la síntesis de proteínas, como los macrólidos (Liu *et al.*, 2011a).

#### **d. Regulación**

El uso de drogas y sustancias químicas por la industria de la acuicultura en Estados Unidos de Norteamérica está estrictamente regulado por la Administración de Alimentos y Drogas (FDA) y la Agencia de Protección Ambiental (EPA). Particularmente, la FDA requiere una evaluación científica de la eficacia de un fármaco y la seguridad de los seres humanos y del ambiente antes de su aprobación. En cambio, la EPA requiere una evaluación científica de la seguridad de los productos químicos antes de que pueda ser registrada y vendida (Benbroock, 2002).

En Estados Unidos como en la Unión Europea, la FDA (Food and Drug Administration), la EPA (Environmental Protection Agency) y la EMEA (European Medicine Agency) solicitan la elaboración de Evaluaciones de Riesgo Ambiental (ERA) para obtener la autorización de mercadeo de los productos farmacéuticos (Santos *et al.*, 2010). Una ERA, se refiere a una evaluación del posible destino, exposición y efectos del producto farmacéutico pero no sugiere su producción ni disposición, esto con la finalidad de asegurar su eficacia, calidad y seguridad para la salud pública y el ambiente (EMEA, 2008).

La Agencia Europea para la Evaluación de Medicamentos (EMEA) ha propuesto un proyecto de guía para la evaluación del riesgo ambiental de medicamentos de uso humano (EMEA, 2005). Se basa en los paradigmas de evaluación de riesgo de los productos químicos industriales y biocidas (Comisión Europea, documento técnico de orientación en apoyo de la Comisión Directiva 93/67/CEE, 2003; European Commission Regulatory, 1997-2006), pero también considera las características específicas de los productos farmacéuticos, por ejemplo, el uso de la información farmacológica disponible, especialmente en los niveles superiores.

Las evaluaciones de riesgos realizadas hasta ahora se han basado principalmente en datos de ecotoxicidad aguda, y por lo general han llegado a la conclusión de que no hay riesgo inmediato, pero el proyecto de EMEA más reciente ha propuesto incluir los datos farmacocinéticos y farmacodinámicos para evaluación

del riesgo ambiental (EMA, 2008). Este enfoque está en la actualidad también se toma dentro de la Unión Europea Proyecto ERA Pharm (Knacker et al., 2005; Kar y Roy, 2010).

En nuestro país no existen mecanismos de regulación y/o evaluaciones periódicas de riesgos ambientales ante el uso constante y excesivo de compuestos farmacéuticos, cabe mencionar que en la NOM-001-ECOL-1996 establece que los límites máximos permisibles de contaminantes en las descarga de aguas residuales en aguas y bienes nacionales, no contempla la evaluación de ningún tipo de fármaco, lo cual refleja una gran problemática de contaminación ambiental.

### III. Justificación.

#### Hipótesis:

El metabolismo fotosintético de *Chlorella vulgaris*, se verá afectado debido a la actividad inhibitoria de síntesis de proteínas a nivel 50S ribosomal de la claritromicina, perturbando principalmente el metabolismo del cloroplasto al poseer ribosomas tipo procarionte, lo cual reflejará la reducción de la actividad metabólica fotosintética.

### IV. Objetivo General

- Caracterizar la actividad fotoquímica del fotosistema II de *Chlorella vulgaris* expuesta a claritromicina.

### V. Objetivos Particulares

- Determinar la concentración de pigmentos fotosintéticos de *Chlorella vulgaris* expuesta a distintas concentraciones de claritromicina.
- Caracterizar el efecto en la actividad fotosintética de *Chlorella vulgaris* causado por la exposición a claritromicina, mediante:
  1. La determinación de la tasa fotosintética máxima (Pmax), el rendimiento cuántico operacional ( $\Phi_{PSII}$ ) a través de la medición de fluorescencia de la clorofila a del fotosistema II
  2. Determinar la estructura y función de la cadena transportadora de electrones fotosintética a través de la medición de cinética polifásica de la fluorescencia de la clorofila a del fotosistema II
  3. Determinar la tasa de liberación de oxígeno.

## **VI. Metodología**

### **1. Organismo**

Se utilizó el alga verde *Chlorella vulgaris* de la clase *Chlorophyceae* y del orden *Chlorococcales* donada por el laboratorio de Biotecnología de Microalgas, del departamento de Biotecnología y Bioingeniería del Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional, Campus Zacatenco.

### **2. Medio de cultivo**

El mantenimiento de los organismos (cultivos semilla), así como los tratamientos experimentales fueron cultivados en una combinación de los medios minerales Bourrely-Setlik libre de EDTA (Borowitzka y Borowitzka, 1988; Kupper *et al.*, 2002).

Las células se mantuvieron sobre un régimen de cultivo en lote con las siguientes condiciones de crecimiento: flujo de aire ( $200 \text{ ml}\cdot\text{min}^{-1}$ ), temperatura ( $20\text{-}25 \text{ }^\circ\text{C}$ ), iluminación ( $200 \text{ }\mu\text{moles}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ ) y fotoperiodo (14/10 luz/oscuridad). Se utilizaron como unidades experimentales de cultivo, botellas cuadradas de vidrio de 500 ml (Schott-Duran ®) con una trayectoria de luz de 7.5 cm y un volumen de trabajo de 250 ml. Para todos los experimentos se utilizaron inóculos sincronizados en la mitad de la fase exponencial, aproximadamente células de 72 h de cultivo.

### **3. Protocolo experimental**

El efecto de la claritromicina en el metabolismo se estudió de acuerdo a los lineamientos de la guía 201 de la Organización para la Cooperación y el Desarrollo Económico (OECD, 2006) para la prueba de sustancias químicas en algas y cianobacterias.

Las unidades experimentales se inocularon con  $4\times 10^5$  células. $\text{L}^{-1}$ , aproximadamente  $5 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  de peso seco o 0.055 de absorbancia a 750 nm. En las

condiciones de cultivo antes mencionadas las células fueron expuestas a las siguientes concentraciones: 0 (control), 0.6, 1.2, 1.8, 2.4 y 3.0 mg.L<sup>-1</sup> de claritromicina durante 72 h de acuerdo al protocolo de la OECD, para después determinar el peso seco (PS), el contenido de pigmentos fotosintéticos y la actividad fotosintética

#### **4. Variables de respuesta**

##### **a) Determinación de peso seco (Crecimiento)**

El crecimiento se determinó a través del peso seco, se tomaron alícuotas de 50 ml de cada muestra experimental (n=3) y se filtraron por vacío en membranas de nitrocelulosa de 5 µm de diámetro de poro (Millipore ®). Previamente, las membranas se llevaron a peso constante manteniéndolas a 70°C por 24 h. Una vez filtradas las muestras, se secaron en horno a 70°C por 48 h, para después determinar el PS de la biomasa seca.

La tasa de crecimiento relativo ( $\mu$ ) se determinó según la siguiente fórmula:

( $\mu = (X_2 - X_1) / (72 - 0)$ ). Donde  $X_2$  es el peso a las 72 h y  $X_1$  es el peso al tiempo 0. La tasa de duplicación celular (td) se calculó según la siguiente fórmula: ( $td = \ln 2 / \mu$ ).

En base a la inhibición del crecimiento para cada muestra experimental comparado con el testigo (100%), se determinó la concentración efectiva media para inhibir el 50% de la población (CE50) de acuerdo a lo establecido en el protocolo 201 de la OECD (OECD, 2006).

##### **b) Determinación de pigmentos fotosintéticos**

El contenido específico de pigmentos fotosintéticos por biomasa seca se cuantificó tomando 2 ml de cultivo de cada tratamiento (n=3). Las muestras se centrifugaron a 3,500 rpm por 10 min a temperatura ambiente. El sobrenadante se eliminó y la pastilla de cada tubo se resuspendió con 2 ml de metanol al 100%. La mezcla metanólica se incubó en baño maría por 10 minutos a 60°C. Transcurrido este

tiempo, la muestra se centrifugó a 3,500 rpm por 10 min a temperatura ambiente, el sobrenadante de cada tubo se aforó a 5 ml con metanol al 100%, para después leer su absorbancia a 666, 653 y 470 nm de longitud de onda. La concentración de clorofila *a*, *b* y carotenoides totales se determinó según las formulas reportadas por Wellburn (1994):

$$\text{Clorofila a } (\mu\text{g.ml}) = (15.65 \times \text{ABS } 666) - (7.34 \times \text{ABS } 653)$$

$$\text{Clorofila b } (\mu\text{g.ml}) = (27.05 \times \text{ABS } 653) - (11.21 \times \text{ABS } 666)$$

$$\text{Carotenoides totales } (\mu\text{g.ml}) = [(1000 \times \text{ABS } 470) - (2.86 \times \text{Clorofila a}) - (129.2 \times \text{Clorofila b})] / 221$$

### **c) Actividad fotosintética por oximetría (respiración y fotosíntesis)**

Transcurrido el tiempo de exposición al claritromicina, se tomó por triplicado de cada lote experimental, lo equivalente en volumen a 50  $\mu\text{g.ml}^{-1}$  de clorofila total (15 ml). Las muestras se centrifugarán a 3,000 rpm por 1min. El sobrenadante se eliminó y la pastilla se resuspendió en 1 ml de una solución de  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  100 mM pH 7,0. La tasa fotosintética se midió como liberación de oxígeno. Las mediciones se realizaron en un oxímetro (Oxygraph, Hansatech®, U.K.) a 30°C por medio de un baño de agua circulante. La tasa de liberación de oxígeno (fotosíntesis) se realizó iluminando la muestra con luz blanca actínica (400-700nm) y un flujo fotónico de 400  $\mu\text{moles}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ . Al momento de apagar la luz, se registró la velocidad de consumo de oxígeno (respiración) por dos minutos para obtener la tasa fotosintética neta.

### **d. Actividad fotosintética por emisión de fluorescencia.**

#### **1) Análisis de la cinética de fluorescencia por PSII: Prueba OJIP**

La emisión polifásica de la fluorescencia de la clorofila *a* en el fotosistema II en muestras acondicionadas a la oscuridad se evaluó utilizando un fluorómetro portátil marca HANDY-PEA (Hansatech, UK), acoplado a la cámara para fase líquida HPEA/LPA (Hansatech, UK). Se tomaron muestras de 2 ml de cada



tratamiento (n=5) y se incubaron a la oscuridad por 20 min a temperatura ambiente (25°C), para después ser irradiadas con una luz roja (660 nm) saturante (3000  $\mu\text{moles}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ ). La emisión de fluorescencia fue registrada por un detector con filtro de corte para emisión a 685 nm. Los valores de la fluorescencia mínima,  $F_o$  a los 50  $\mu\text{s}$ , la fluorescencia máxima,  $F_M$  a los 200 ms y la fluorescencia variable ( $F_v = F_M - F_o$ ) fueron registrados automáticamente por el equipo. La interpretación de los datos se realizó con el programa Handy-PEA desarrollado por la misma Compañía (Hansatech, UK) y el programa Biolizer-HP3, diseñado en el Laboratorio de Bioenergética de la Universidad de Ginebra, Suiza. Los parámetros medidos (tabla 1) y la interpretación de los mismos se realizaron según el análisis de la prueba de OJIP (van Heerden *et al.*, 2004).

Tabla 1. Parámetros cinéticos de la prueba de OJIP (van Hereden et al., 2004)

<b>Parámetros Técnicos</b>		
Fluorescencia a 50 $\mu\text{s}$	$F_o$	
Fluorescencia máxima	$F_M$	
Fluorescencia variable	$F_v$	$= F_M - F_o$
Pendiente desde el origen de la fluorescencia	$M_o$	$= 4 \cdot [(F_{300\mu\text{s}} - F_o) / (F_M - F_o)]$
Fluorescencia variable a 2 ms	$V_j$	$= (F_{2\text{ms}} - F_o) / (F_M - F_o)$
Fluorescencia variable a 30 ms	$V_i$	$= (F_{30\text{ms}} - F_o) / (F_M - F_o)$
<b>Flujos específicos expresados por centros de reacción (RC)</b>		
Absorción por RC	$ABS/RC$	$= (M_o / V_j) / (1 - F_o / F_M)$
Atrapamiento a tiempo 0 por RC	$TR_o/RC$	$= M_o / V_j = (ABS/RC) \phi P_o$
Disipación a tiempo 0 por RC	$Dl_o/RC$	$= (ABS/RC) - (TR_o/RC)$
Transporte electrónico a tiempo 0 por RC	$ET_o/RC$	$= (TR_o/RC) \psi_o$
<b>Productos (o relaciones de flujo)</b>		
Producto cuántico máximo de la fotoquímica primaria	$\phi P_o$	$= TR_o / ABS = (F_M - F_o) / F_M = F_v / F_M$
Producto cuántico máximo de disminución de excitación no fotoquímica	$\phi D_o$	$= Dl_o / ABS = 1 - \phi P_o = F_o / F_M$
Producto cuántico máximo para que un excitón atrapado mueva un electrón después de QA	$\psi_o$	$= ET_o / TR_o = 1 - V_j$
Producto cuántico máximo para el transporte de electrones en PSII	$\phi E_o$	$= \phi P_o \cdot \psi_o = (TR_o / ABS) / (ET_o / TR_o) = ET_o / ABS = (1 - F_o / F_M) (1 - V_j)$

<b>Rendimientos cuánticos y eficiencias</b>		
Flujo específico de transferencia de electrones de $Q_B$ hasta el lado aceptor del PSI	$(TR_o/RC) \cdot (1 - V_i)$	$= M_o / VJ \cdot (1 - V_i)$
Eficiencia con la que un electrón de los transportadores de electrones entre sistemas se mueve para reducir el lado aceptor del PSI	$\delta R_o$	$= (1 - V_i) / (1 - V_j)$
Eficiencia cuántica para el transporte de electrones en los acarreadores intermedios y los acarreadores finales del lado aceptor del PSI	$\Phi R_o$	$[1 - (F_o/FM)] \psi E_o \cdot \delta R_o$
<b>Índices vitales</b>		
Índice de rendimiento en base a la absorbancia	$PI_{ABS}$	$= [RC/ABS] [ \phi P_o / (1 - \phi P_o) ] [ \Psi_o / (1 - \Psi_o) ]$
Índice de rendimiento total	$PI_{TOTAL}$	$= PI_{ABS} \cdot \delta R_o / (1 - \delta R_o)$

## II) Rendimiento cuántico operacional del fotosistema II ( $\Phi PSII$ )

El análisis de la disipación de la energía y el transporte electrónico se realizó por medio de la técnica de pulsos saturante utilizando un equipo de fluorescencia FMS (Fluorescence Monitoring System, Hansatech, U.K). La eficiencia cuántica para el transporte electrónico ( $\Phi PSII$ ), se realizó determinando la emisión de fluorescencia en tapetes celulares, que se obtuvieron filtrando 15 ml o su equivalente en densidad óptica de cada tratamiento en membranas de nitrocelulosa de 5  $\mu m$ . La emisión de fluorescencia se realizó colocando el tapete celular en las pinzas de hojas y ajuntándolas a la fibra óptica. La hidratación del tapete celular se mantuvo utilizando una porción de papel filtro saturado con agua destilada, colocado por debajo del filtro de nitrocelulosa. El valor de  $F_o$  a temperatura ambiente, se obtuvo irradiando la muestra con una luz modulada de baja intensidad ( $0.1 \mu moles \cdot m^{-2} \cdot s^{-1}$ ), y después de 10 segundos se sobrepuso un pulso saturante de luz blanca de  $10,000 \mu moles \cdot m^{-2} \cdot s^{-1}$  por 0.8 segundos, para cerrar todos los centros de reacción y obtener el valor máximo de fluorescencia en estado estacionario  $F_M'$  y el estacionario  $F_S'$ . Utilizando estos valores se calculó la eficiencia cuántica de

operación para el fotosistema II ( $\Phi$ PSII) según la siguiente fórmula reportada por Maxwell y Johnson, (2000):  $\Phi$ PSII =  $F_M' - F_S / F_M'$

El decaimiento fotoquímico (NPQ) se determinó incubando las muestras en la oscuridad por 20 minutos. El valor de  $F_0$  a temperatura ambiente, se obtuvo irradiando la muestra con una luz modulada de baja intensidad ( $0.1 \mu\text{moles} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ ), y después de 10 segundos se sobrepuso un pulso saturante de luz blanca de  $10,000 \mu\text{moles} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$  por 0.8 segundos, para cerrar todos los centros de reacción y obtener el valor máximo de fluorescencia  $F_M$  en oscuridad. Inmediatamente después del pulso saturante se irradiaron muestras con una luz actínica blanca no saturante de  $500 \mu\text{moles} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ , por cinco minutos hasta alcanzar un estado estacionario para después sobreponer un pulso saturante de luz blanca de  $10,000 \mu\text{moles} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$  por 0.8 segundos y obtener el valor de  $F_M'$ . La eficiencia cuántica para la disipación no fotoquímica (NPQ) se calculó utilizando la fórmula reportada por Maxwell y Johnson, (2000).

$$\Phi\text{NPQ} = F_M - F_M' / F_M'$$

La determinación de la tasa fotosintética máxima ( $P_{\text{max}}$ ), el rendimiento cuántico para el transporte electrónico ( $\alpha$ ), se determinó variando la intensidad lumínica de 0 a  $900 \mu\text{moles} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$  (Liu *et al.*, 2009) y cuantificando la tasa de transporte electrónico aparente:  $\text{ETR} = (\Phi\text{PSII}) \cdot (0.5) \cdot (\mu\text{moles fotones} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1})$ .

### **Análisis estadísticos**

Los datos experimentales se reportan como las medias de seis tratamientos con desviación estándar (con replicas,  $n=3-8$ ), se utilizó el método de Análisis de Varianza (ANAVA) de un solo factor, con al menos una diferencia estadísticamente significativa (Prueba de Tukey). Todos los análisis estadísticos se produjeron usando System SAS 9.0 (A todos los conjuntos de datos se realizaron pruebas estadísticas de distribución normal y homogeneidad de varianzas para pruebas paramétricas).

## VII. Resultados y Discusión

### A. Crecimiento

Los resultados de la presente investigación muestran que la exposición a claritromicina sobre *Chlorella vulgaris* durante el crecimiento en un periodo de 72 horas inhibe la división celular, la cantidad volumétrica de pigmentos fotosintéticos y la actividad metabólica fotosintética.

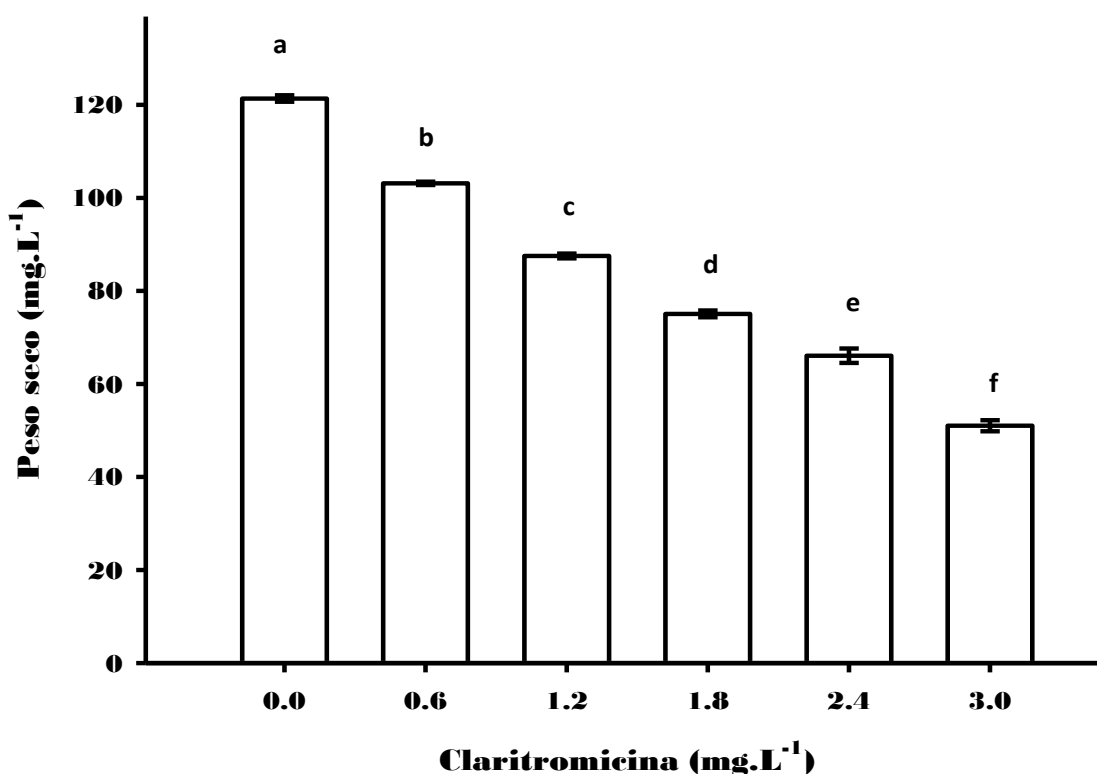


Figura 3. Efecto inhibitorio de las concentraciones de claritromicina sobre el crecimiento de *C. vulgaris* traducido en peso seco al término del tratamiento durante 72 horas de exposición (n=3) (Letras diferentes indican diferencias significativas según la prueba de Tukey  $p < 0.05$ ).

La figura 3, muestra el efecto inhibitorio de la claritromicina sobre el crecimiento de *C. vulgaris*, observando que el peso seco ( $\text{mg.L}^{-1}$ ) disminuyó conforme aumentó la concentración de la claritromicina en el medio de cultivo. El crecimiento celular disminuyó 57.97% en la máxima concentración probada (3  $\text{mg.L}^{-1}$ ) con respecto al control, indicando que existen diferencias estadísticamente significativas en todos los tratamientos ( $p < 0.05$ ).

Pomati *et al.* (2004) encontraron que la eritromicina reduce la densidad celular de *Synechocystis sp* en concentraciones mayores a  $100\mu\text{g.L}^{-1}$  durante 5 días de tratamiento. Mientras que Campa *et al.* (2006) demostraron que el cloranfenicol y la eritromicina (antibióticos inhibidores de síntesis de proteínas a nivel  $50\text{S}$  ribosomal) inhiben el crecimiento de *Chaetoceros gracilis*, en dosis mayores de  $0.5$  y  $1.0\text{ mg.L}^{-1}$  respectivamente.

Liu *et al.* (2011b) observaron que la eritromicina induce un efecto de inhibición significativo sobre la tasa de crecimiento en *Selenastrum capricornutum* utilizando concentraciones de  $0.06\text{ mg.L}^{-1}$ . Además, Lai *et al.* (2009) encontraron que el cloranfenicol inhibe el crecimiento celular en microalgas marinas como en *Chlorella pyrenoidosa* en concentraciones relativamente bajas ( $2.5$  a  $50\text{ mg.L}^{-1}$ ).

Gómez en 2012 indicó que la estreptomina (antibiótico inhibidor de síntesis de proteínas) inhibe el crecimiento celular de *Chlorella vulgaris* hasta un  $50.68\%$  en la máxima concentración probada ( $2.4\text{ mg.L}^{-1}$ ). Esta reducción en el crecimiento es un efecto producido por la inhibición de la fijación de  $\text{CO}_2$ , debido a que la estreptomina inhibe la acumulación de ribulosa 1,5 bifosfato (RuBP) y ribulosa 1,5 bifosfato carboxilasa (RuBisCO) (Tomisek *et al.*, 1957; Freyssinet *et al.*, 1984, Quian *et al.*, 2010).

De igual manera, la tasa de crecimiento relativo ( $\mu$ ) de *C. vulgaris* se redujo significativamente ( $p < 0.05$ ), en el caso de la concentración  $3.0\text{ mg.L}^{-1}$  de claritromicina, la tasa de crecimiento celular disminuyó  $62.45\%$  a las 72 horas de exposición con respecto al control (Fig. 4). En concordancia con los datos obtenidos Gómez (2012), demostró que la estreptomina provoca una reducción en la velocidad de crecimiento del  $33.50\%$  en la máxima concentración probada ( $2.4\text{ mg.L}^{-1}$ ) en la microalga *C. vulgaris*.

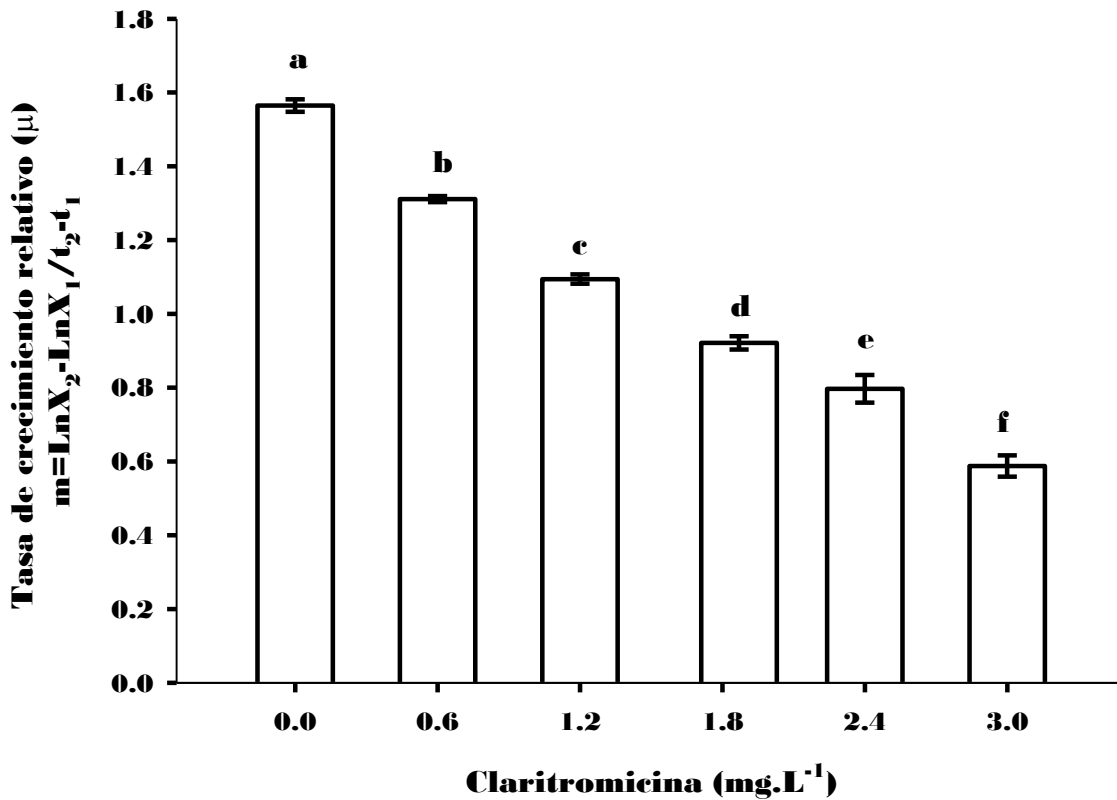


Figura 4. Tasa de crecimiento relativo ( $\mu$ ) de *C. vulgaris* durante 72 horas de exposición frente a distintas concentraciones de claritromicina. (n=3) (Letras diferentes indican diferencias significativas según la prueba de Tukey  $p < 0.05$ ).

En similitud con la disminución de la tasa de crecimiento, el tiempo de duplicación de la población aumentó significativamente ( $p < 0.05$ ) de 10.63 horas en el grupo control a 28.36 horas en el tratamiento 3 mg.L<sup>-1</sup>, se observa que en este último tratamiento la duplicación celular se retrasa 17 horas comparado con el control. El patrón muestra que a mayor concentración del antibiótico el tiempo de división celular es mayor (Fig. 5).

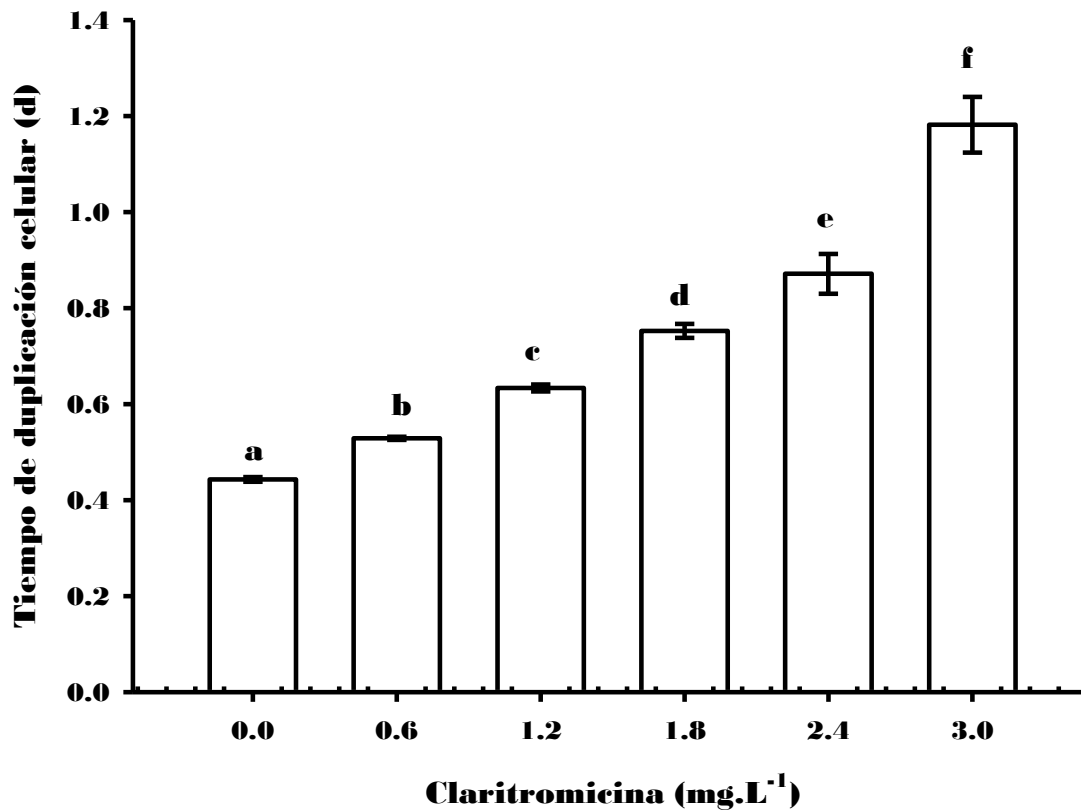


Figura 5. Tiempo de duplicación celular de *C. vulgaris* durante 72 horas de exposición frente a distintas concentraciones de claritromicina. (n=3) (Letras diferentes indican diferencias significativas según la prueba de Tukey  $p < 0.05$ ).

En base a la inhibición del crecimiento para cada muestra experimental comparado con el testigo (100%), la concentración efectiva media necesaria para inhibir el 50% (CE50) del crecimiento de *C. vulgaris* es de 2.61 mg.L<sup>-1</sup> de claritromicina (Fig. 6), según los lineamientos establecidos por la OECD. Todos los ensayos experimentales ofrecen una idea global de la toxicidad a largo plazo que causa la claritromicina sobre *C. vulgaris*.

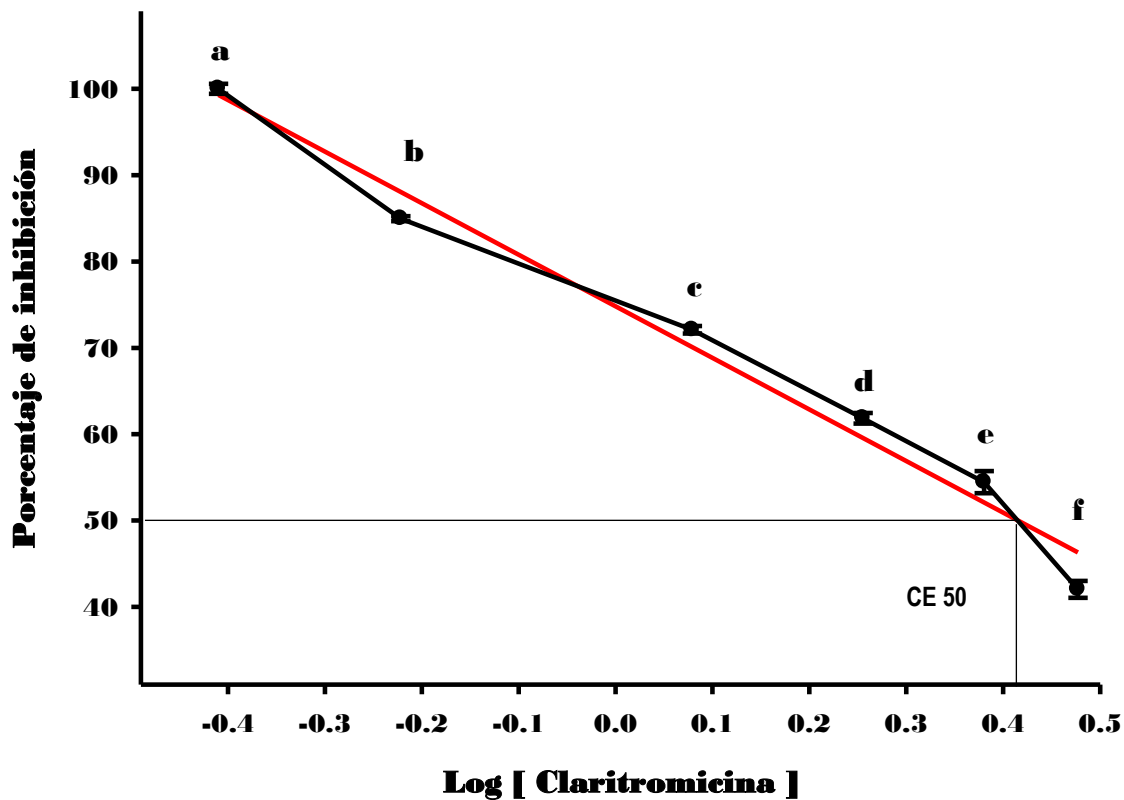


Figura 6. Porcentaje de inhibición de *C. vulgaris* expuesta a claritromicina durante 72 horas, el gráfico muestra la concentración media efectiva (CE50), cuyo valor nominal es  $2.61\text{mg.L}^{-1}$  de claritromicina, el cual fue determinado en este estudio (de acuerdo a los lineamientos de la guía 201 de la Organización para la Cooperación y el Desarrollo Económico) (n=3).

## B. Contenido de clorofila a, b y carotenoides totales.

La clorofila desempeña un papel importante en la fotosíntesis de los organismos fotoautótrofos como las algas. El contenido suficiente y la localización precisa son fundamentales para garantizar el proceso de reacciones fotoquímicas, en la captación de energía y la transferencia de electrones durante la fotosíntesis.

Dieciséis enzimas son codificadas por genes nucleares y son utilizadas en la biosíntesis de clorofila por lo que la claritromicina no debería tener efectos inhibitorios directos en el proceso de síntesis de estas enzimas. Sin embargo muchos complejos proteínicos son codificados por el cloroplasto y los genes



nucleares, y la expresión correspondiente entre dos genomas es indispensable para la biosíntesis de la clorofila, por lo que la eritromicina, la claritromicina y otros antibióticos inhibidores de síntesis de proteínas podrían interferir con la biosíntesis de clorofila a través de la inhibición de genes del cloroplasto, y luego afectar más aún la expresión de genes nucleares indirectamente (Liu *et al.*, 2011b).

El contenido de clorofila *a* y *b*, así como de carotenoides totales ( $\text{mg.L}^{-1}$ ) decreció significativamente ( $p < 0.05$ ) después de la exposición a claritromicina durante 72 h. Como se puede observar en la figura 7, el contenido de clorofila total (*a+b*) disminuyó alrededor de un 20% en la primera concentración probada ( $0.6 \text{ mg.L}^{-1}$ ), mientras que el contenido de carotenoides totales no disminuyó significativamente sino hasta que la concentración del antibiótico en el medio de cultivo rebasó  $2.4 \text{ mg.L}^{-1}$ . La inhibición de la síntesis de clorofila y carotenoides fue de 46.91% y 36.79% respectivamente a la máxima concentración probada ( $3.0 \text{ mg.L}^{-1}$ ) con respecto al control (Fig. 7).

W. Linnane y R. Sterwart (1967) demostraron que algunos antibióticos inhibidores de síntesis de proteínas como el cloranfenicol, la tetraciclina, la lincosamina, y algunos macrólidos (eritromicina y espiramicina) tienen la habilidad de inhibir la síntesis de clorofila en *Euglena gracilis*.

Bishop y Smillie en 1970 encontraron que algunos compuestos como el cloranfenicol inhibe significativamente la biosíntesis de clorofila en *Euglena gracilis*. Mientras que Koussevitzky *et al.*, (2007) indicaron que algunos antibióticos pueden interrumpir la expresión de genes del cloroplasto e inhibir la síntesis de la clorofila.

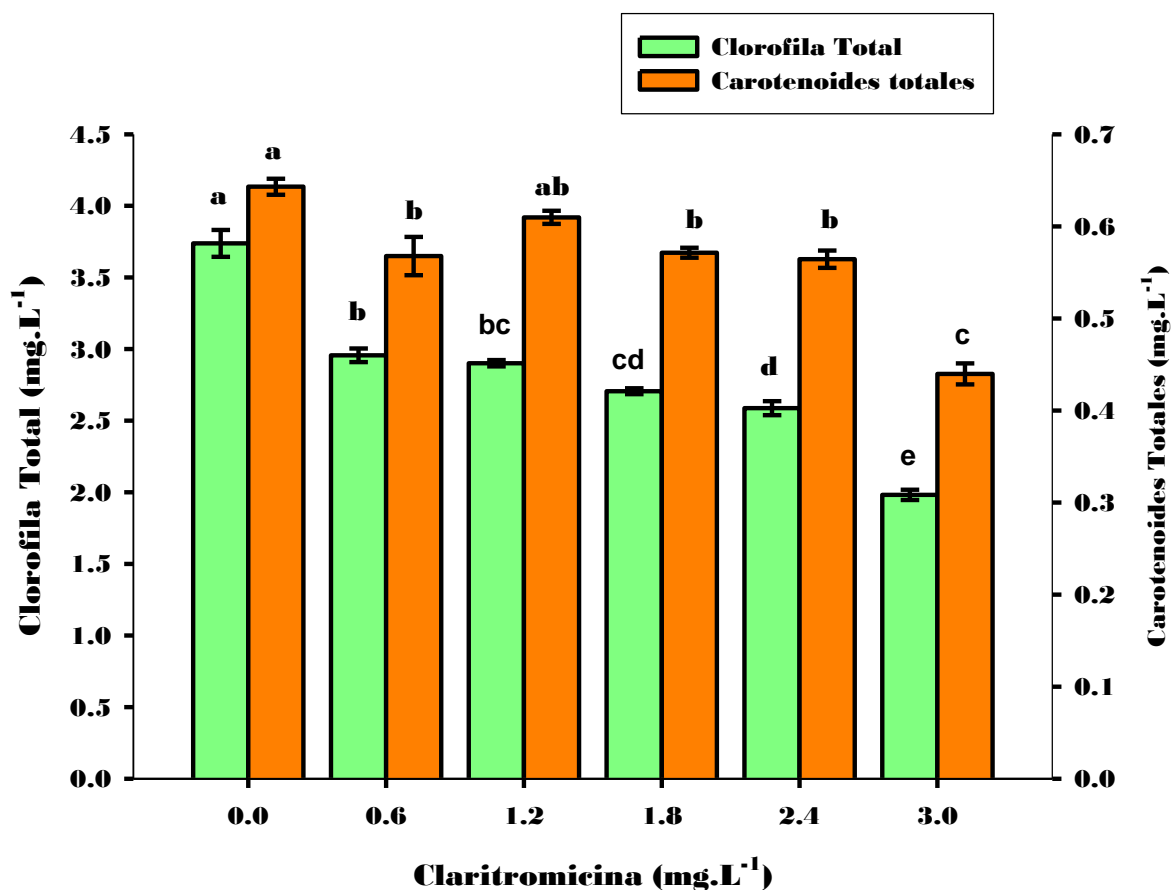


Figura 7. Contenido volumétrico de pigmentos fotosintéticos en *C. vulgaris* después de 72 horas de exposición a distintas concentraciones de claritromicina (n=3) (Letras diferentes indican diferencias significativas según la prueba de Tukey  $p < 0.05$ ).

Asimismo, Liu *et al.*, (2011b) encontraron que el ácido  $\delta$ -aminolevulinico, el porfobilinogeno, el uroporfirinógeno III, el coproporfirinógeno III, la protoporfirina IX y la protoclorofilina, precursores de la biosíntesis de la clorofila en *Selenastrum capricornutum* se redujeron significativamente después de la exposición a eritromicina, esto demostró que la eritromicina tiene la capacidad de inhibir la biosíntesis de clorofila a concentraciones muy bajas (0.06 mg.L<sup>-1</sup>).

Por otro lado, se ha demostrado que la eritromicina tiene la capacidad de inhibir el ciclo de glutatión-ascorbato y componentes en el ciclo de las xantofilas en *Pseudokirchneriella subcapitata*; particularmente sobre el estado de conversión de violaxantina a zeaxantina, este último decrece cuando aumenta la concentración de eritromicina (Nie *et al.*, 2013). Asimismo, la biosíntesis de glutatión está

estrechamente relacionada con la fotosíntesis, por lo que la disminución de glutatión está relacionado con los efectos inhibidores de eritromicina sobre la fotosíntesis (Liu *et al.*, 2011b), lo que puede conducir a un estrés oxidativo y a la generación de especies reactivas de oxígeno (ROS por sus siglas en inglés).

Es importante mencionar que a los carotenoides se les considera como antioxidantes *in vivo*, estas moléculas tienen la capacidad de “apagar” los radicales libres (ROS) intracelulares (Thuenhan, 1990). Se puede inferir que la poca disminución sobre la cantidad de los carotenos podría tener una función protectora, puesto que estos compuestos (carotenos y xantofilas) presentan en los organismos fotosintéticos una función doble, como pigmentos accesorios en la captación de energía fotónica y como moléculas capaces de disipar energía de excitación excedente en forma de calor, evitando daños importantes a los fotosistemas.

La evidencia anterior puede explicar el efecto inhibitorio de la claritromicina sobre el contenido clorofila total (a/b) y carotenoides totales, ya que en las concentraciones más elevadas del antibiótico es posible que se generaran elevadas concentraciones de radicales libres de oxígeno, lo que pudo haber provocado un apagado masivo y desacoplamiento de estructuras proteínicas asociadas a los pigmentos fotosintéticos e indispensables para el correcto funcionamiento de los fotosistemas.

### **C. Actividad fotosintética: Liberación de oxígeno, transporte electrónico y disipación térmica de energía de excitación**

La liberación fotosintética de oxígeno (Fig. 8) indica que la claritromicina produce un efecto inhibitorio sobre la actividad fotosintética encontrando diferencias estadísticamente significativas en al menos un par de tratamientos ( $p < 0.05$ ); en la concentración más alta ( $3.0 \text{ mg.L}^{-1}$ ) se denota un aumento sobre la tasa fotosintética, de igual manera la tasa de respiración aumenta a partir de la

concentración 2.4 mg.L<sup>-1</sup> cuyo efecto inhibió 81.23% sobre esta última concentración, mientras que en la concentración 3.0 mg.L<sup>-1</sup> disminuyó 32.97% respecto al control, en concentraciones mayores a 1.8 mg.L<sup>-1</sup> existe un retraso de la fotosíntesis y una respiración acelerada.

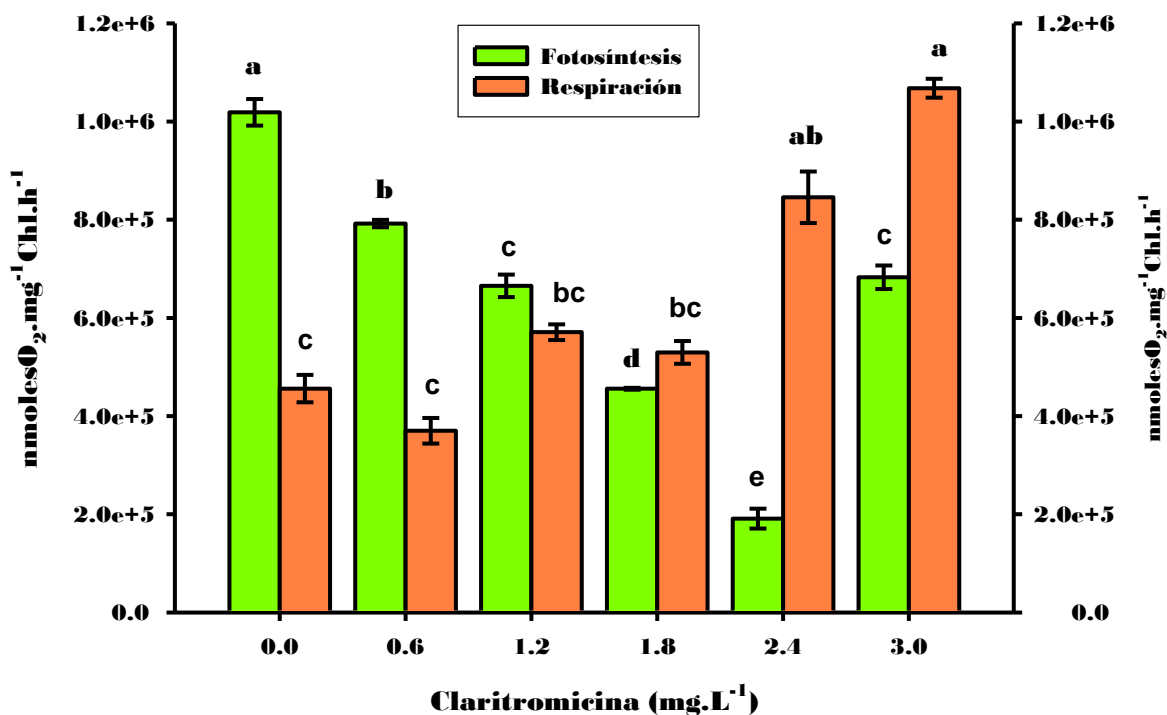


Figura 8. Liberación y consumo fotosintético de oxígeno (fotosíntesis y respiración) de *C. vulgaris* frente a 72 horas de exposición a distintas dosis de claritromicina. (n=3) (Letras diferentes indican diferencias significativas según la prueba de Tukey p<0.05).

Estudios anteriores han demostrado que muchas proteínas importantes en el cloroplasto, tales como el centro de reacción del PS II (7 tipos de proteínas, incluyendo proteínas D1 y D2), el complejo cytb6-f, son codificadas por genes del cloroplasto. Se ha comprobado que la eritromicina puede inhibir la síntesis de estas proteínas sobre la membrana en los tilacoides de algas como el centro de reacción PSII y el complejo cytb6-f y finalmente, da lugar a la disminución del contenido de proteínas de la membrana (Liu *et al.*, 2011a).

La liberación de oxígeno, así como el ensamblaje de las proteínas de los complejos antena del PSII (LCHII) depende de la síntesis de estas proteínas (D1 y D2); podemos deducir que muchas de las proteínas codificadas en el genoma del cloroplasto están siendo inhibidas, lo cual pudiera estar afectando la estructura y función del fotosistema II y el complejo liberador de oxígeno dando como resultado una inhibición de la liberación fotosintética de oxígeno (fig. 8).

La evidencia en los resultados encontrados en el consumo y liberación de oxígeno sugieren que las concentraciones más elevadas de claritromicina provocan un desacoplamiento de la membrana tilacoidal y de la membrana interna de la mitocondria, por lo que el gradiente transmembranal no tiene una regulación, como resultado el transporte de electrones aumenta, incrementándose la tasa de liberación y consumo de oxígeno (Belyaeva *et al.*, 2011), estos efectos pueden explicar el aumento en las tasas de fotosíntesis y respiración en las concentraciones más elevadas del antibiótico (Fig. 8).

La producción fotosintética de oxígeno es un proceso que está directamente relacionado con la absorción lumínica y el transporte electrónico en la membrana tilacoidal. Ambos procesos puede ser monitoreados y cuantificados a través de la emisión de fluorescencia de la clorofila *a* del fotosistema II. La velocidad del transporte electrónico (ETR) medido por la emisión de fluorescencia, representa el producto fotoquímico operacional ( $\Phi_{PSII}$ ) del PSII, es decir; la eficiencia de uso fotónico en una condición lumínica dada.

La figura 9 muestra el máximo transporte electrónico fotosintético ( $P_{max}$ ) se puede observar que en concentraciones superiores a  $1.2 \text{ mg.L}^{-1}$  disminuye la capacidad fotosintética. Por otro lado, los valores más bajos de  $P_{max}$  se registraron en la máxima concentración probada ( $3 \text{ mg.L}^{-1}$ ) alcanzando una reducción del 38.93% con respecto al control ( $p < 0.05$ ).

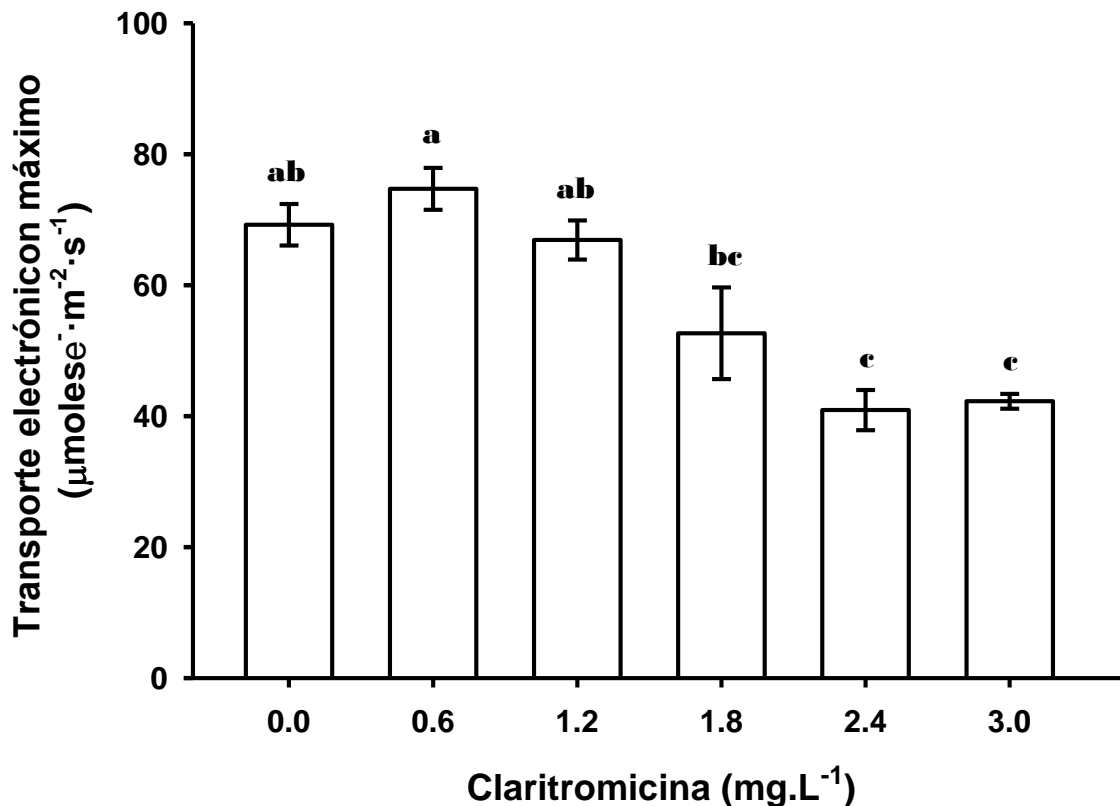


Figura 9. Tasa fotosintética máxima en saturación de luz ( $\mu\text{mole}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ ) en *C. vulgaris* a 72 horas de exposición de claritromicina. Este parámetro refleja el nivel de energía lumínica que comienza a saturar el fotosistema, lo cual indica una fotosíntesis máxima ( $n=5$ ) (Letras diferentes indican diferencias significativas según la prueba de Tukey  $p<0.05$ ).

Lu *et al.*, (2003) encontró que la reducción de  $\Phi\text{PSII}$  se debe al aumento de los procesos de relajación no fotoquímica; por otra parte Liu *et al.*, (2011a) demostraron que antibióticos macrólidos como la eritromicina son capaces de inhibir la síntesis de las cuatro grandes subunidades de la ribulosa 1,5 bifosfato carboxilasa/oxigenasa, interfiriendo con la fijación de  $\text{CO}_2$ .

Esto nos indica que la claritromicina en el medio de cultivo produce un incremento en los centros de reacción cerrados y por lo tanto existe una disminución en el transporte electrónico fotosintético, lo cual afecta directamente la fijación de  $\text{CO}_2$  y por ende en la asimilación de carbono en biomasa.

La eficiencia de utilización de la energía lumínica para impulsar el transporte electrónico, se calculó a partir del aumento lineal de la tasa de transporte electrónico (ETR) vs la irradiación ( $\mu\text{molesfotones}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ ) (Blache *et al.*, 2011). La figura 10 muestra que al aumentar la concentración de claritromicina en el medio de cultivo, la eficiencia para utilizar la energía lumínica ( $\alpha$ ), disminuye significativamente ( $p<0.05$ ), siendo esta reducción de 59.55% en el último tratamiento probado ( $3\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ ) con respecto al control.

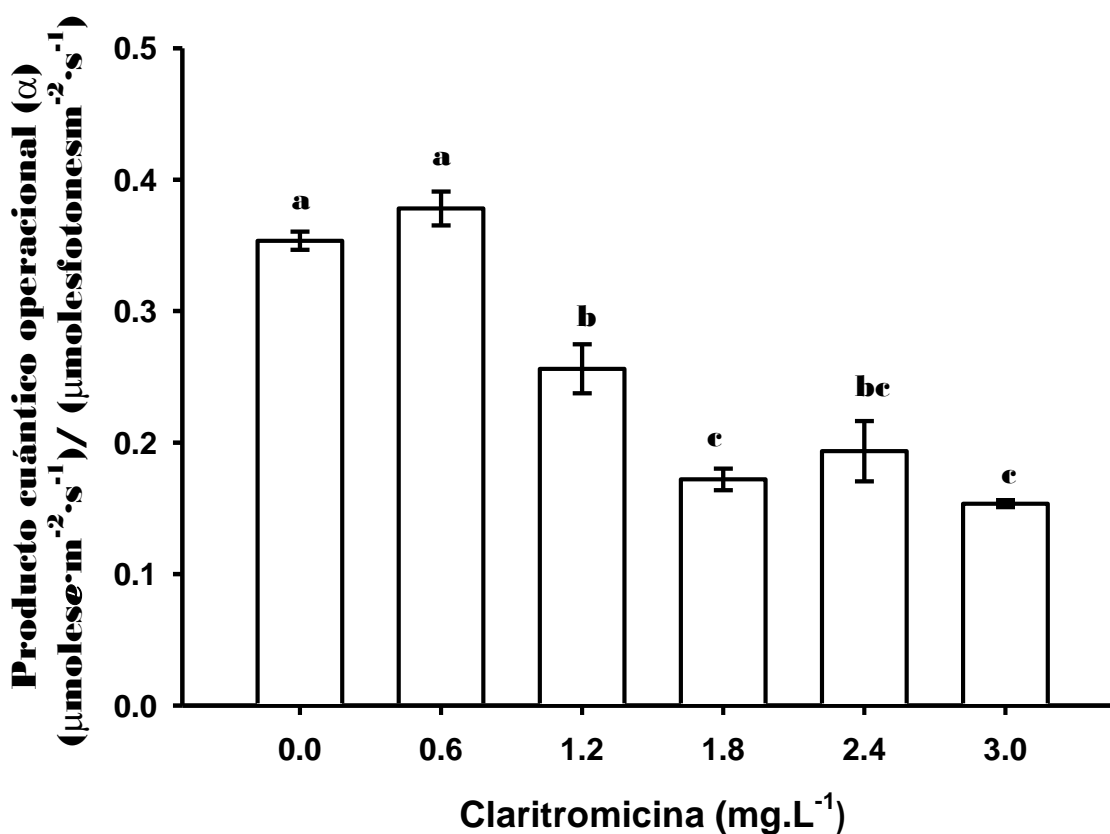


Figura 10. Eficiencia cuántica operacional ( $\alpha$ ) medido en *C. vulgaris* después de 72 horas de exposición frente a claritromicina. ( $n=3$ ) (Letras diferentes indican diferencias significativas según la prueba de Tukey  $p<0.05$ ).

Es importante mencionar que el desempeño fotosintético (eficiencia de captura de energía fotónica para transfórmala en energía química) depende de características bioquímicas específicas, tales como la actividad de la enzima

Rubisco, el contenido volumétrico de clorofila *a*, y la eficiencia del transporte electrónico de los fotosistemas I y II (Chen *et al.*, 1999).

Estas evidencias sugieren que la claritromicina provocan una reducción en la capacidad fotosintética, la eficiencia fotoquímica y daños o deterioros en la maquinaria fotosintética de las algas, a través de la inhibición de síntesis de proteínas estructurales de los centros de reacción del PSII, por lo que la eficiencia cuántica operacional se reduce (Stirbet y Govindjee., 2012).

Los procesos de disipación no fotoquímica (NPQ por sus siglas en inglés) del PSII son una medida aproximada de la disipación térmica en el aparato fotosintético de las algas. La disipación del exceso de energía como calor es uno de los procesos de relajación de la excitación fotónica; por lo tanto, es uno de los mecanismos de fotoprotección más importantes para los organismos fototróficos. (Carbonera *et al.*, 2012; Ocampo *et al.*, 2013).

Los procesos de NPQ regulan y protegen el proceso fotosintético en condiciones ambientales en las cuales la energía absorbida excede la capacidad de utilización para llevar a cabo trabajo fotoquímico. Los resultados indican que el número de centros de reacción abiertos disminuyen, por lo que elevadas cantidades de energía fotónica no pueden ser absorbidas por los complejos antena; debido a esto, el exceso de flujo fotónico tiende a ser eliminado por rutas disipadoras de energía principalmente a través de NPQ.

La claritromicina provoca un descenso sobre la disipación de energía de excitación a través de procesos no fotoquímicos del 29.95% en la concentración 0.6 mg.L<sup>-1</sup> con respecto al control ( $p < 0.05$ ), sin embargo la disipación no fotoquímica tiende a aumentar a partir del primer tratamiento conforme aumenta la concentración. No se han encontrado reportes del efecto de los macrólidos en el proceso de disipación térmica, sin embargo; es probable que la inhibición de la síntesis de proteínas cloroplásticas provoque cambios conformacionales en las



proteínas relacionadas con el proceso de relajación no-fotoquímica (NPQ), lo cual reduce los valores de NPQ en las células tratadas con claritromicina (Fig. 11) (González *et al.*, 2008).

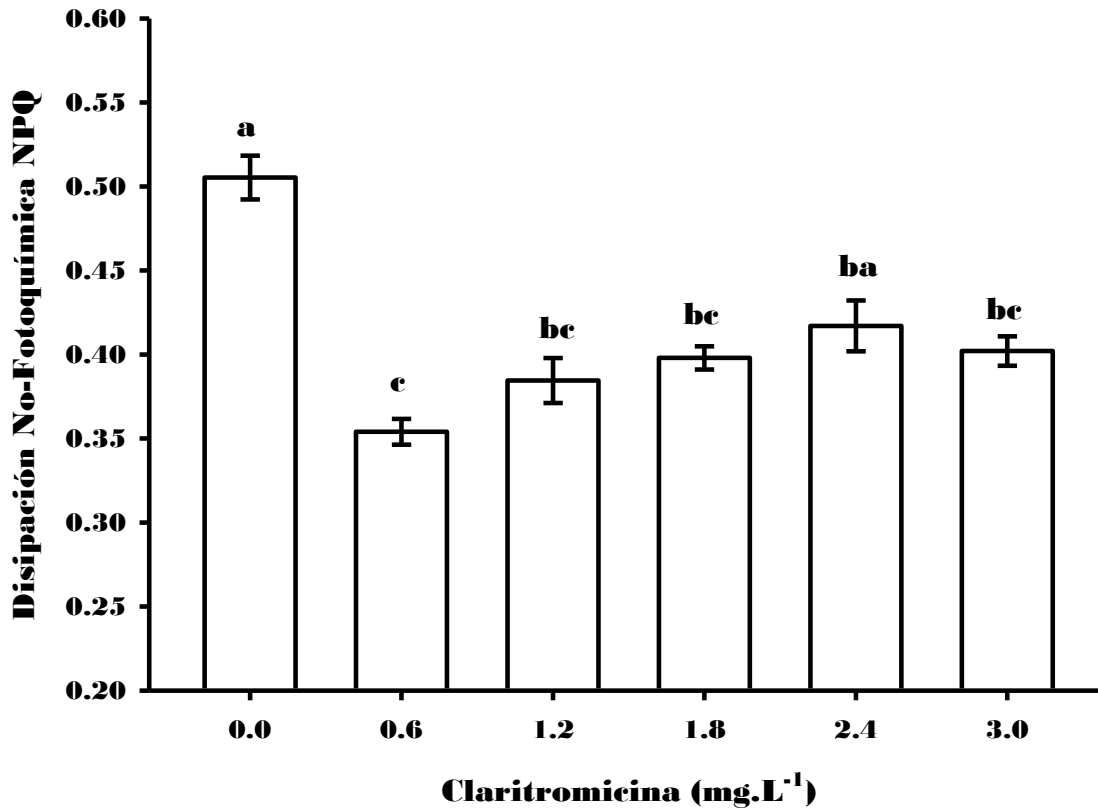


Figura 11. Disipación No-Fotoquímica (NPQ) de *Chlorella vulgaris* expuesta a distintas concentraciones de claritromicina durante 72 horas (n=5) (Letras diferentes indican diferencias significativas según la prueba de Tukey  $p < 0.05$ ).

Estudios anteriores han demostrado que la disipación vía NPQ es causado por que la energía de excitación es transferida a la zeaxantina y esta se convierte en calor; sin embargo se ha comprobado que la eritromicina tiene un efecto inhibitorio en la concentración de carotenoides totales, por ende la claritromicina puede tener un impacto medianamente regulado sobre el ciclo de las xantofilas (Nie *et al.*, 2013); debido a que pueden existir diferencias sobre los efectos de los macrólidos entre especies de microalgas.

Gómez (2012) indicó que la estreptomicina provoca un aumento en la disipación de energía de excitación a través de procesos no fotoquímicos hasta un 30% en *C. vulgaris*, mientras que Jiang *et al.*, (2003) encontraron que a elevadas irradiaciones en presencia de estreptomicina provoca un incremento de NPQ en *Zea mays* de hasta 400% a diferencia del control.

#### **D. Análisis de la fluorescencia polifásica de la clorofila a del fotosistema II**

El primer paso de la fotosíntesis es la absorción de fotones por moléculas del complejo antena en algunos femtosegundos ( $fs = 1e^{-15}s$ ), lo que conduce a la formación de clorofilas excitadas ( $Chl^*$ ). La función principal de la antena (el complejo captador de luz) es transferir energía de excitación a los centros de reacción fotosintéticos. La separación de la carga primaria ocurre en ambos fotosistemas tanto en el PSI como en el PSII, con la participación del núcleo de reacción de P700 y P680, respectivamente. Las cargas positivas producidas por el PSII oxidan el agua a través de  $Y_z$  (tirosina-161 en la proteína D1), liberando  $O_2$  molecular en el complejo liberador de oxígeno (OEC). La carga negativa (el electrón) se encuentra primero en la molécula feofitina (Feo) y se pasa luego a la quinona primaria ( $Q_A$ ), y luego a la quinona secundaria ( $Q_B$ ), la cual es un aceptor de dos electrones; la  $Q_B$  reducida después se protona para convertirse en plastoquinol ( $PQH_2$ ) (Stirbert y Govindjee, 2011).

El análisis de la cinética de fluorescencia ofrece información sobre la cinética de transferencia de energía de excitación en los complejos antena y la fase de óxido reducción en los PSI y PSII. La fotosíntesis oxigénica implica dos reacciones de luz que operan simultáneamente en centros de reacción PSII y PSI. La energía absorbida por los dos fotosistemas se convierte en flujos de electroquímica (energía libre de Gibbs) esta se utiliza para oxidar el agua en oxígeno, reducir el  $NADP^+$ , y producir ATP. Cabe mencionar que la mayor parte de la fluorescencia de la clorofila a se origina en los complejos antena del PSII.

La energía fotónica absorbida por las moléculas de la clorofila puede liberarse en una de tres rutas (Fig. 12): (1) esta puede ser utilizada para llevar a cabo el trabajo fotosintético (fotoquímica), (2) puede ser disipado como calor o (3) este puede ser reemitido como energía luminosa de menor energía (fluorescencia de la clorofila). Estos tres procesos ocurren en competitividad, por lo que un incremento en la eficiencia de uno se reflejara en la disminución de los otros dos. (Maxwell y Johnson, 2000).

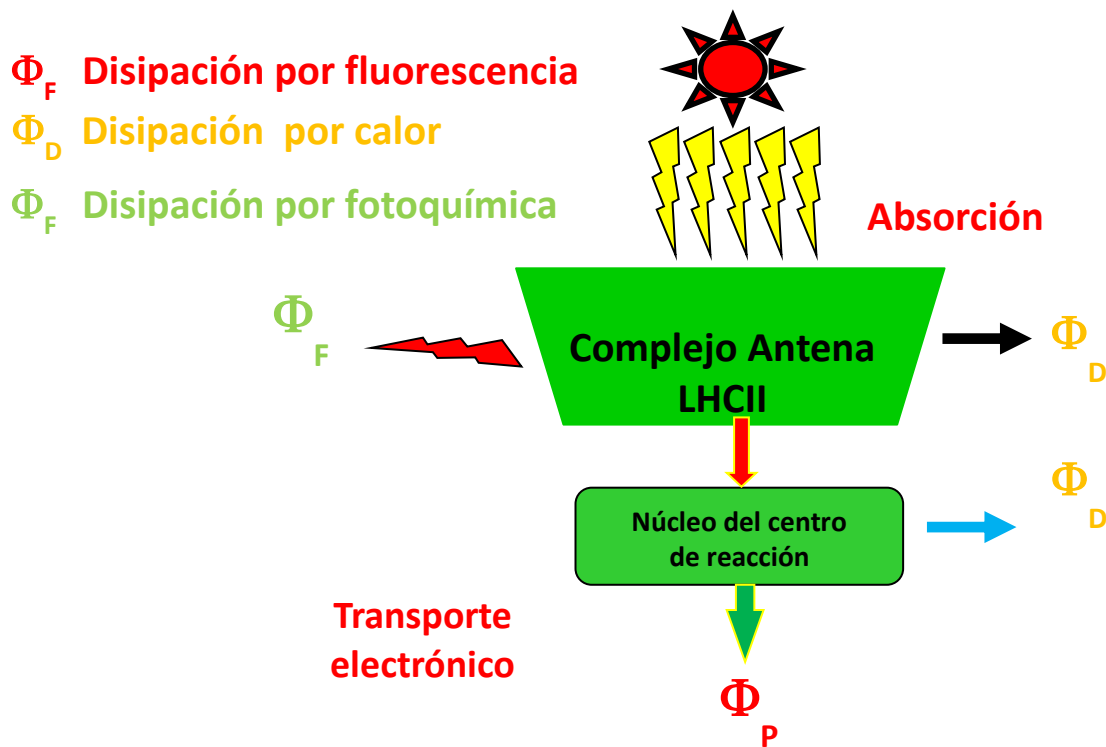


Figura 12. Modelo de absorción y disipación de energía fotónica a través del complejo cosechador de luz (LHCII) y el centro de reacción (RC).

Cuando se mide la emisión de fluorescencia de la clorofila del fotosistema II en organismos fotosintéticos adaptados unos minutos a la oscuridad, se obtiene una curva de inducción de fluorescencia denominada curva de Kautsky en la que se observan diferentes fases denominadas O-K-J-I-P (Fig. 13).

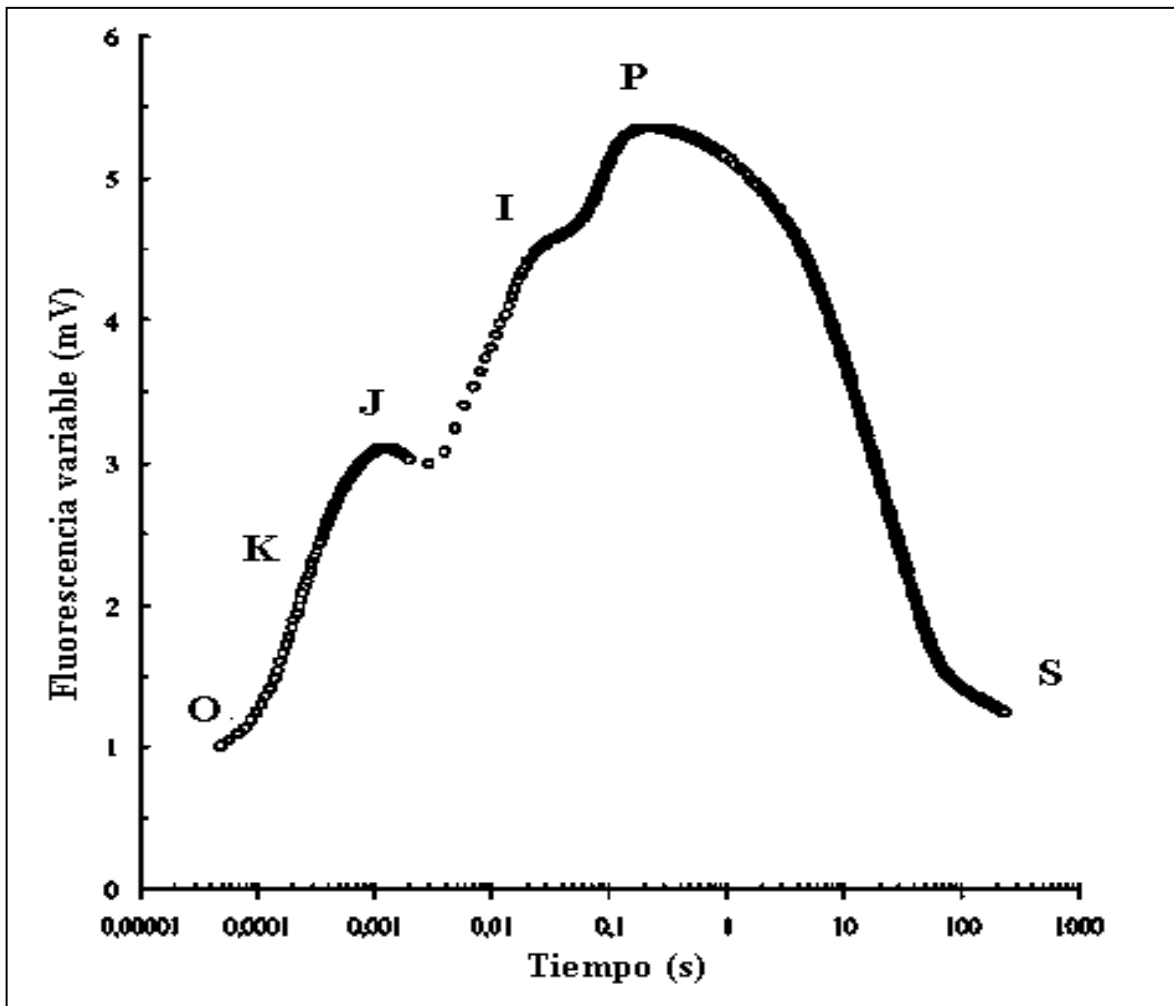


Figura 13. Modelo de cinética de fluorescencia variable (curva de Kautsky) graficado en tiempo logarítmico (O-K-J-I-P).

En donde O, (1) es el valor mínimo de la fluorescencia ( $F_0$ ). Aparece alrededor de los 20-50  $\mu$ s, en ese momento todos los centros de reacción están oxidados. En esta fase de la fluorescencia, todos los centros de reacción están “abiertos”, lo que quiere decir que la primera quinona aceptora de electrones del PSII ( $Q_A$ ) esta oxidada y el centro de reacción del PSII no ha perdido su electrón.

La fase K, (2) emerge aproximadamente a los 300  $\mu$ s después de la inducción, está relacionada con el complejo liberador de oxígeno (CLO) y solo puede ser observada cuando el transporte electrónico entre  $Q_A$  y  $Q_B$  está

parcialmente bloqueado o cuando la actividad de lado donador del fotosistema II esta disminuida (Strasser, 1997).

La fase J, (3) se desarrolla alrededor de los 2 ms ( $F_J = F_{2ms}$ ) y está relacionada con la reducción parcial de  $Q_A$ ; y se incrementa cuando existe un bloqueo del transporte electrónico entre  $Q_A$  y  $Q_B$ .

La fase I, (4) se desarrolla a los 20 ms ( $F_I = F_{20ms}$ ) y está relacionada con la reducción parcial de  $Q_A$  y  $Q_B$ .

La última fase de la cinética polifásica es la fase P, (5) y es cuando se alcanza el valor máximo de la fluorescencia ( $F_M$ ). El tiempo en el que se alcanza depende del protocolo experimental aunque en condiciones fisiológicas normales se alcanza en alrededor de 300 a 500 ms. En este momento todos los centros de reacción han perdido su electrón y todas las moléculas de  $Q_A$  se encuentran reducidos, estos centros se denominan centros de reacción "cerrados". (Gonzales *et al.*, 2008).

La cinética entre I y P está relacionada con la reducción total de la plastocianina, así como la reducción de los aceptores finales del lado donador del PSI ( $F_d$  y NADH), por lo cual la pendiente entre estas fases implica la velocidad en como ocurren estos procesos (Gonzales *et al.*, 2008).

La prueba O-K-J-I-P considera cada una de las inflexiones de la curva, los valores extremos ( $F_0$  y  $F_M$ ), así como la pendiente inicial de la emisión de la fluorescencia de la clorofila *a* en el PSII ( $M_0$ ). Utilizando estos valores se pueden calcular los parámetros descritos en la tabla 1 (van Heerden *et al.*, 2003).

Cuando el PSII absorbe energía fotónica y  $Q_A$  ha aceptado un electrón, no es capaz de aceptar otro hasta que el primero ha pasado al siguiente acarreador de electrones, la quinona B ( $Q_B$ ). Durante este periodo, el centro de reacción está (cerrado) porque está totalmente reducido. En cualquier punto en el tiempo, la presencia de una proporción de centros de reacción reducidos (cerrados),

conduce a una disminución en la eficiencia fotoquímica, con un correspondiente incremento en la fluorescencia (Maxwell y Johnson, 2000). Por lo tanto, la determinación del rendimiento de fluorescencia de la clorofila dará información sobre los cambios en la eficiencia de la actividad fotoquímica, la disipación de calor del PSII y del “llenado” de la poza de plastoquinona (PQ) (Gonzales *et al.*, 2008).

La figura 14 muestra la cinética de emisión de fluorescencia del PSII, existe un incremento en la fluorescencia mínima ( $F_0$ ) a medida que aumenta la concentración de la claritromicina. El aumento de la fluorescencia mínima ( $F_0$ ) puede ser atribuido a que existe una menor transferencia de excitones de los complejos antena hacia el centro de reacción, esto indica que el número de centros de reacción cerrados incrementa, por lo que estos no participan en el transporte electrónico.

El incremento de  $F_0$  es un indicativo de la actividad de los centros de reacción del PSII, el cual refleja la pérdida de una gran parte de energía absorbida por los complejos antena que hayan podido transmitir energía de excitación a los centros de reacción. Por otro lado, el incremento de ( $F_0$ ) pudiera indicar un daño o cambio conformacional de las antenas o del mismo centro de reacción, lo cual impide una correcta canalización de la energía absorbida.

La reducción de  $F_M$  puede ser interpretada como cambio de la estructura del centro de reacción en PSII lo cual pudiera provocar un incremento del número de centros de reacción cerrados que no participan en el transporte electrónico (Zhu *et al.*, 2011). También está relacionado a una disminución de la concentración de clorofila en los complejos antena o a una disminución de la actividad del complejo liberador de oxígeno (Strasser, 1997). (Ver tabla 2)

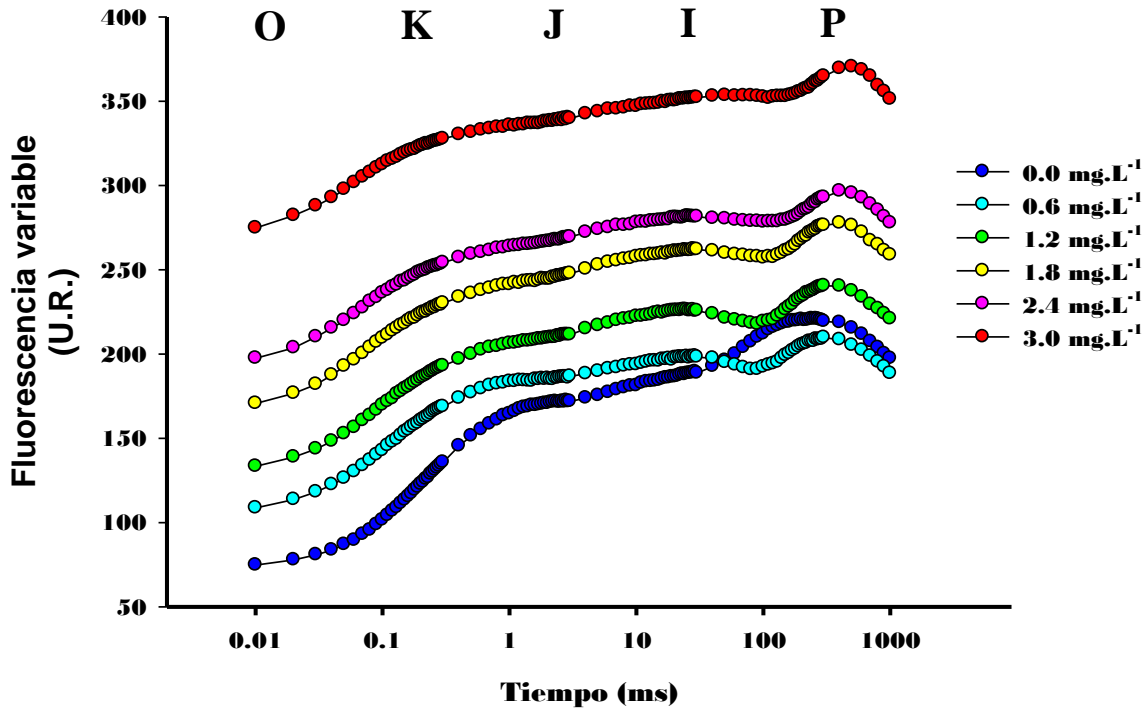


Figura 14. Cinética de fluorescencia variable (U.R.) expresada en tiempo logarítmico, emitida por el PSII en *C. vulgaris* expuesta a claritromicina durante 72 horas.

La figura 15 muestra la cinética de emisión de fluorescencia normalizada en  $F_0$ , esta grafica nos permite observar que los valores de  $F_M$  se reducen conforme incrementa la concentración de claritromicina. El aumento de la fluorescencia desde  $F_0$  a  $F_M$  sigue una cinética más o menos sigmoidea; sin embargo el efecto que causa la claritromicina propicia la disminución de la velocidad de emisión de fluorescencia, conforme aumenta la concentración del antibiótico, esto puede ser atribuido a una reoxidación de los  $Q_A^-$  por  $Q_B$ , del PSII (Briantais *et al.*, 1986).

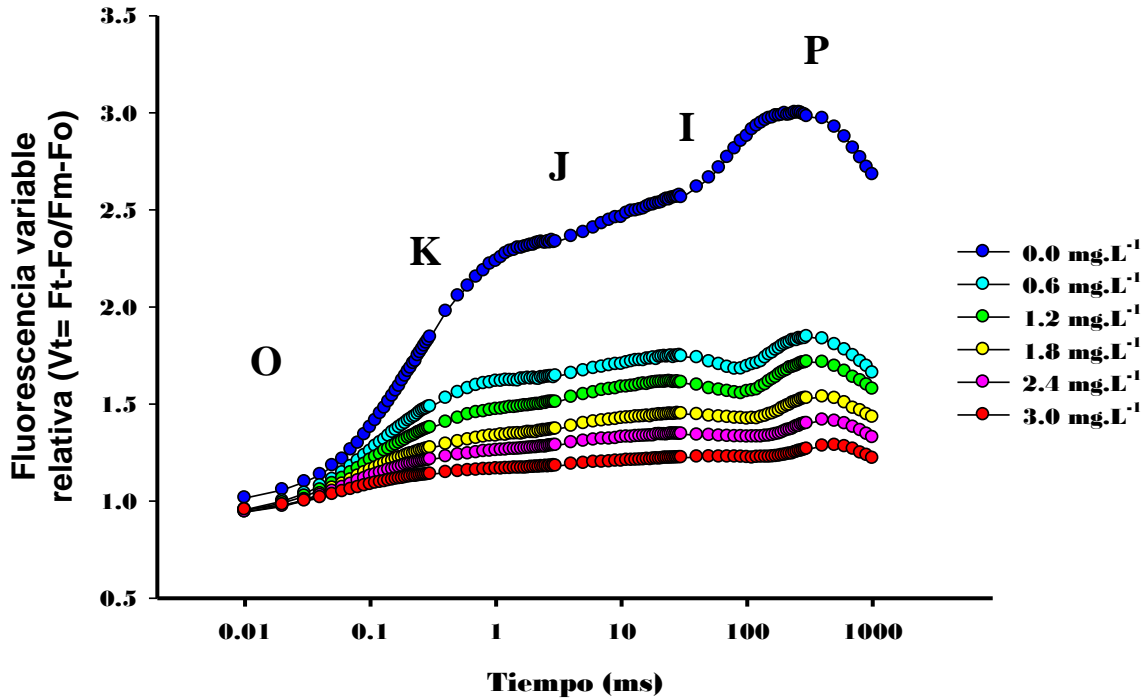


Figura 15. Cinética de emisión de fluorescencia medida en el PSII en *C. vulgaris* expuesta a claritromicina durante 72 horas (datos normalizados en  $F_0$ ).

Gómez en 2012 demostró que la estreptomycinina provoca un incremento en la fluorescencia mínima ( $F_0$ ) de *C. vulgaris*, a medida que aumenta la concentración; asimismo en los primeros tratamientos observo una reducción de  $F_M$ . Mientras que Liu *et al.*, (2011a), observaron que la eritromicina provoca un descenso en los niveles de  $F_M$  en *S. capricornotum*.

Este efecto es indicativo que puede existir un cambio estructural en los centros de reacción, lo cuales no son capaces de transmitir electrones de manera eficiente del lado aceptor de electrones ( $Q_{A-}$ ) hacia el aceptor de electrones secundario ( $Q_B$ ) y por ende disminuye la velocidad de reducción hasta la poza de plastoquinona (PQ).



Con el objetivo de visualizar el efecto de la claritromicina en cada fase de la cinética de la emisión de fluorescencia, las inflexiones fueron graficas como fluorescencia variable en el tiempo,  $[Vt = (Ft - F_0)/(F_M \cdot F_0)]$  (Fig. 16), esta expresión se toma como una medida de la fracción reducida del primer aceptor de electrones del PSII, la quinona A ( $Vt = \frac{Q_{A^-}}{Q_A + Q_{A^-}}$ ). Esta expresión permite comparar las muestras considerando solo la acumulación dinámica de  $Q_A$  en su forma reducida ( $Q_{A^-}$ ) (Gonzales *et al.*, 2008).

Como se puede observar en la figura 16, en los primeros ( $50\mu s - 100\mu s$ ), la velocidad de reducción de  $Q_A$  se incrementa rápidamente por efecto de la claritromicina, sin embargo; cuando se alcanza la fase K ( $300\mu s$ ) el valor de  $M_0$  es similar estadísticamente en todos los tratamientos (Ver tabla 2). Esto indica que la claritromicina acelera la tasa de reducción de  $Q_A$  a través del tiempo; sin embargo, esta decae cuando incrementa la concentración de claritromicina, probablemente alterando la velocidad de reducción de  $Q_A$  o quizás alterando los niveles de  $Q_A$ , es posible que este incremento en la velocidad de reducción de los centros de reacción del PSII sea provocado por que algunos centros de reacción no puedan llevar a cabo la separación de cargas, debido a que existe un daño estructural sobre los complejos.

Asimismo, un aumento en la fluorescencia variable en J-I ( $V_J - V_I$ ) es un indicativo de que existe un bloqueo parcial del flujo de electrones en  $Q_A$  y  $Q_B$ . La fase J-I representa la acumulación del PSII con un incremento en estado  $Q_{A^-} - Q_{2B}$ , donde la acumulación de  $Q_{A^-}$  depende de la cinética de oxidación por la quinona aceptora ( $Q_B$ ).

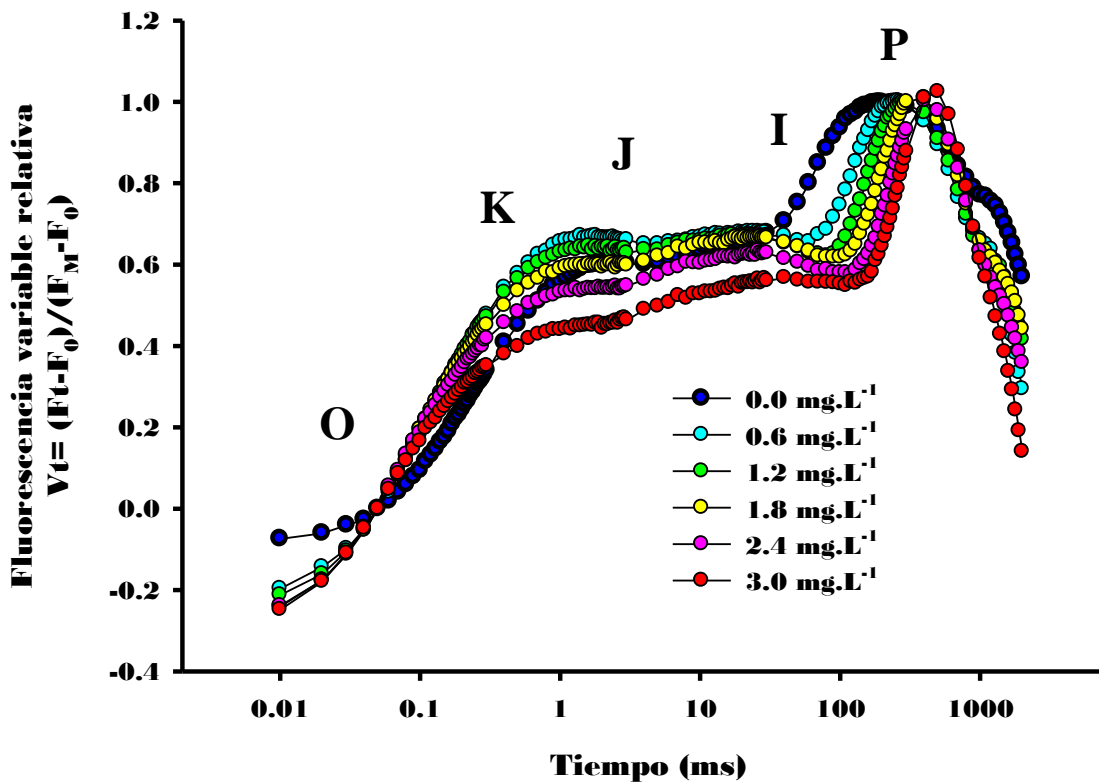


Figura 16. Fluorescencia variable relativa de *C. vulgaris* expuesta a distintas concentraciones de claritromicina durante 72 horas (esta expresión permite observar la reducción de  $Q_A$ , “datos mostrados en la tabla 2”).

Tabla 2. Efecto de las concentraciones de la claritromicina sobre la fluorescencia mínima, máxima, variable y en la fluorescencia variable en las fases J e I y I la pendiente inicial de la fluorescencia ( $M_0$ ).

Parámetro	Concentración (mg.L <sup>-1</sup> )					
	0	0.6	1.2	1.8	2.4	3.0
$F_0$	74±2.42	114±1.64	140±0.89	181±3.32	209±4.96	287±3.86
$F_M$	360±4.95	287±6.35	269±5.12	231±4.17	202±2.66	213±5.63
$F_V$	139±3.61	88±1.42	91±3.43	88±2.09	78±2.73	73±1.96
$V_J$	0.68±0.01	0.81±0.01	0.76±0.01	0.72±0.02	0.74±0.02	0.68±0.01
$V_I$	0.76±0.05	0.88±0.11	0.85±0.11	0.83±0.11	0.83±0.12	0.78±0.13
$M_0$	1.46±.012	2.09±0.34	1.91±0.34	1.82±0.32	1.86±0.35	1.73±0.33

En correlación a nuestros resultados se ha comprobado que antibióticos inhibidores de síntesis de proteínas como la eritromicina provocan un aumento en la pendiente inicial en la emisión de la cinética de fluorescencia de la clorofila a en el PSII ( $M_0$ ) en *S. capricornutum*, esto indica que antibióticos como la eritromicina y la claritromicina conducen a reducir el número de transportadores de electrones en el lado aceptor del centro de reacción del PSII, inhibiendo el transporte de electrones después de  $Q_A$  (Liu *et al.*, 2011a).

Para observar detalladamente el efecto de la claritromicina en las diferentes fases del transporte electrónico se graficaron los valores calculados de la fluorescencia variable relativa (Fig. 16), estos datos fueron graficados como  $\Delta Vt$ , restándole al valor experimental de  $Vt$  al valor de  $Vt$  del control (Fig. 17).

Después del incremento rápido inicial de fluorescencia debido a la reducción de  $Q_A$  continua transfiriéndose los electrones a  $Q_B$ , pero debido a la carencia de electrones procedentes del complejo liberador de oxígeno, la intensidad de fluorescencia decrece formándose una inflexión (K), lo que evidencia un desacoplamiento del complejo liberador de oxígeno y las reacciones del transporte electrónico entre la feofitina y el aceptor primario de electrones ( $Q_A$ ) (Fig. 17).

La fase K se cree que resulta de la separación de carga estable sólo posible cuando el CLO está completamente destruido, porque  $Y_Z$  puede proveer solo un electrón (Tóth *et al.*, 2007). Por otro lado, la fase J-I se asocia con el estado redox de  $Q_A$ ,  $Q_B$ , el estado redox de la plastoquinona, el estado redox de los aceptores finales y el lado aceptor del PSI (Strasser *et al.*, 2004; Chen y Chen, 2010).

Como se puede apreciar en la figura 17, muestra el efecto de la claritromicina sobre las distintas fases de la fluorescencia inducida del PSII, particularmente la fase K se incrementa comparado con el control, sin embargo tiene un efecto descendente conforme incrementa la concentración de la

claritromicina, indicando que existe una inhibición del transporte de electrones sobre el complejo liberador de oxígeno comparado con la muestra control. Esta reducción también pudiera ser causada por una reducción de los centros de reacción activos (Fig. 22).

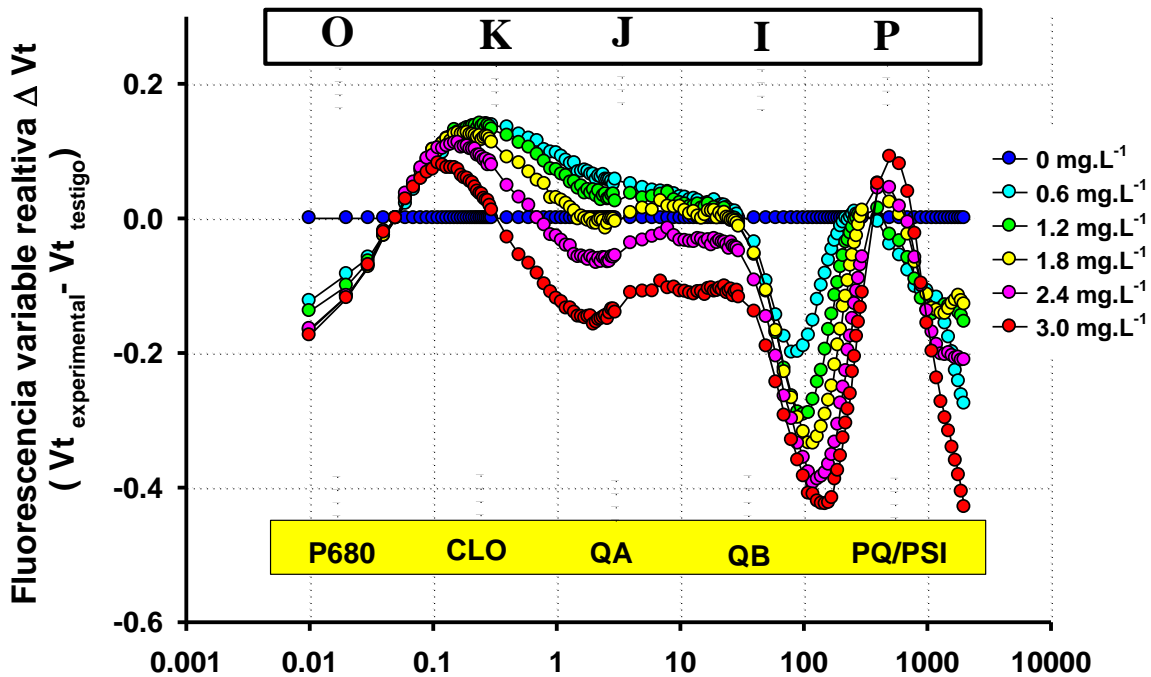


Figura 17: Efecto de la claritromicina sobre la cinética de emisión de fluorescencia variable relativa  $\Delta Vt$  ( $Vt_{\text{experimental}} - Vt_{\text{testigo}}$ ) medida en *C. vulgaris* expuesta a los tratamientos de claritromicina durante 72 horas.

Por otro lado, la figura 17 muestra que el valor de la fluorescencia entre la fase J y la fase I adquieren valores negativos, lo que se puede explicar por dos causas: (1) la disminución del aporte de electrones desde el complejo liberador de oxígeno (Yusuf *et al.*, 2010); (2) la estimulación del transporte electrónico en los aceptores finales del PSI (Fig. 30), el cual provocaría una rápida oxidación de  $Q_A$  por  $Q_B$ , estimulando el flujo entre las fases J e I como se observa en la figura 17.

Por último se observa que los valores entre la fase I-P adquieren valores negativos, lo que es indicativo de una estimulación en la oxidación de los aceptores de electrones del PSI (ver figura 30), sobre la plastoquinona (PQ) o en el acarreo electrónico del lado aceptor del PSI, probablemente relacionado al aumento del flujo cíclico del fotosistema I, donde la ferredoxina (Fd) puede donar sus electrones a la plastoquinona (PQ) por medio del complejo citocromo en la subunidad 559, cuando esto sucede se establece un transporte cíclico de electrones; dicho efecto genera un gradiente de  $H^+$  para producir ATP, lo cual puede explicar el incremento en el transporte de electrones y el incremento de la tasa de liberación y consumo de oxígeno en la concentración más elevada de la claritromicina.

Con el objetivo de visualizar la estimulación de la fase I a P se graficaron los valores de  $\Delta V_t$  en presencia de claritromicina, donde las células fueron expuestas al herbicida metil viológeno (N,N'-dimetil-4,4'-bipiridinio dicloruro), se puede observar que la estimulación entre estas fases fueron inhibidas; ya que dicho compuesto químico funciona como un aceptor de electrones el cual "secuestra" los electrones del lado aceptor del fotosistema I, a nivel del centro ferrosulfurado  $F_A F_B$ , lo cual comprueba que la estimulación encontrada entre las fases I a P, se debe a un aumento en el flujo cíclico del fotosistema I (Fig. 18).

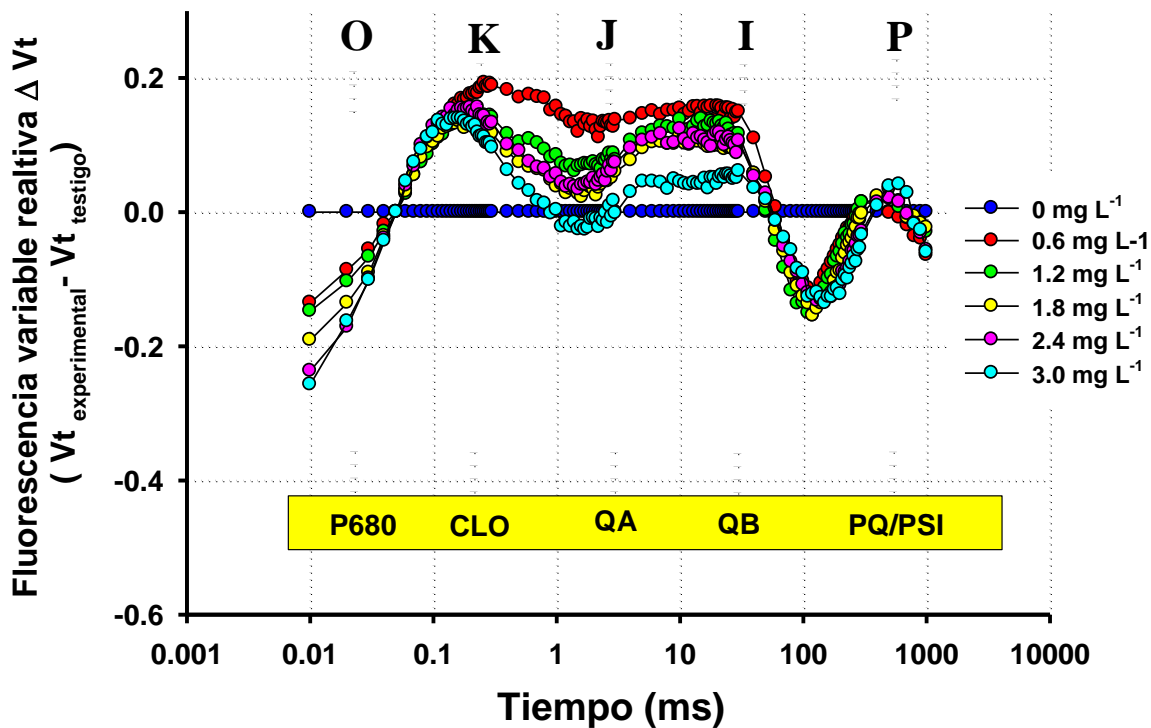


Figura 18: Efecto de la claritromicina en presencia de metil viológeno sobre la cinética de emisión de fluorescencia variable relativa  $\Delta Vt$  ( $Vt_{\text{experimental}} - Vt_{\text{testigo}}$ ) medida en *C. vulgaris* expuesta a los tratamientos de claritromicina incluyendo metil viológeno durante 72 horas.

### E. Función del complejo liberador de oxígeno (CLO)

El fotosistema II es responsable de la oxidación del agua en la fotosíntesis de organismos como las algas. Este sistema comprende el núcleo del PSII y el complejo cosechador de luz de la clorofila periférica (Chl a/b) complejo de proteínas II (LHCII). En los tilacoides el PSII está presente principalmente como supercomplejo, este consiste en un núcleo dimérico del PSII: un centro de reacción (RC), las subunidades D1 y D2 y las proteínas de antena CP47 y CP43 y un número variable de LHCII, que están destinados a PSII ya sea fuertemente (S), moderada (M) o ligeramente (L). Por otra parte, las proteínas LHCII menores CP29, CP26 y CP24 participan en la unión de los trímeros del complejo antena del PSII; el complejo del PSII cataliza la descomposición del agua en oxígeno molecular a través del complejo liberador de oxígeno (Balsera, 2004).

La actividad de los complejos liberadores de oxígeno se puede calcular utilizando la fase K de la cinética de fluorescencia de la clorofila del PSII (Strasser, 1997) como un indicador de desactivación del CLO, con esta información se puede calcular la fracción de los CLO activos de la siguiente manera (Appenroth *et al.*, 200; Liu *et al.*, 2011a):

$$V_K = (F_{300\mu s} - F_0) / (F_M - F_0) \qquad V_j = (F_{2ms} - F_0) / (F_M - F_0)$$

$$\text{Fracción de CLO activos} = \left[ \left( 1 - \left( \frac{V_K}{V_j} \right) \right) \right] \exp / \left[ \left( 1 - \left( \frac{V_K}{V_j} \right) \right) \right]_{\text{testigo}}$$

Como se puede observar en la figura 19, la fracción de complejos liberadores de oxígeno activos se reduce significativamente ( $p < 0.05$ ), reduciéndose en 42.97% en la concentración más alta ( $3 \text{ mg.L}^{-1}$ ) con respecto al control; como ya se ha mencionado la reducción del CLO puede estar relacionado con un desacoplamiento de las proteínas D1 y D2 en el centro de reacción del PSII, el desacoplamiento del CLO provocaría una disociación de Mn, además de un desplazamiento del equilibrio redox entre  $Q_A$  y  $Q_B$ , aumentando el tiempo de residencia de un electrón en  $Q_A$  en relación con  $Q_B$ .

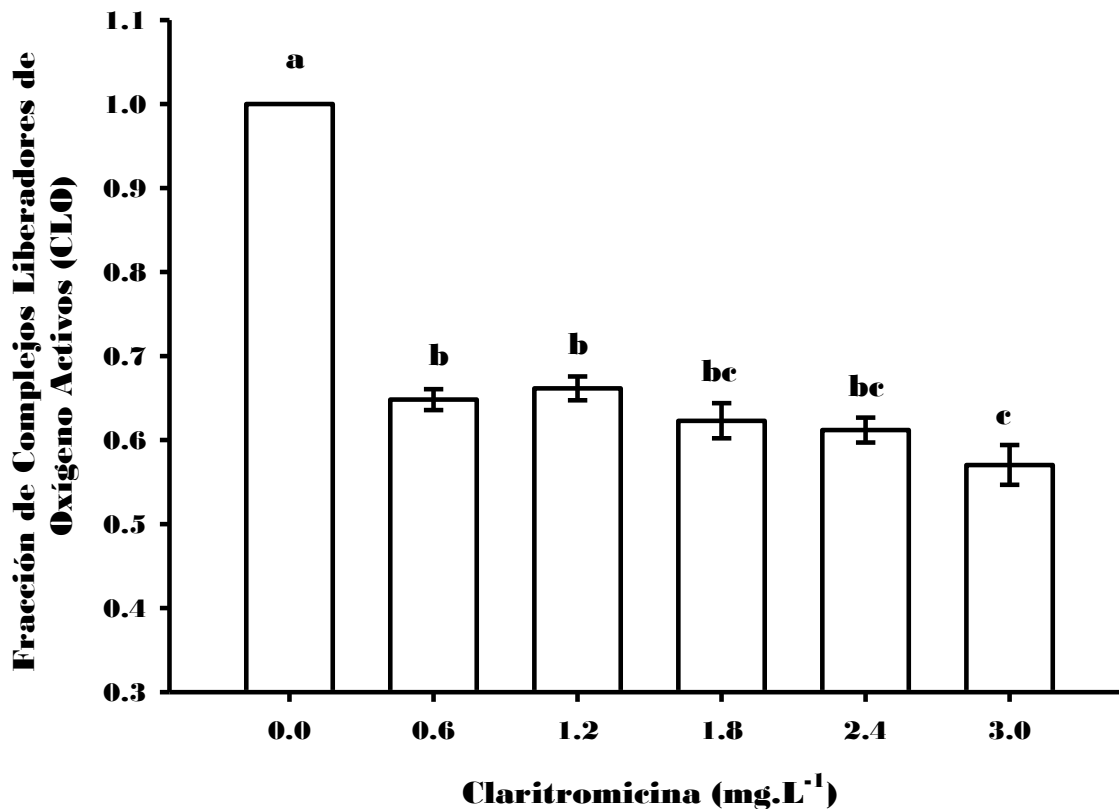


Figura 19: Efecto de la claritromicina sobre la fracción del complejo liberador de oxígeno activos medido en *C. vulgaris* expuesta a claritromicina durante 72 horas (n=8) (Letras diferentes indican diferencias significativas según la prueba de Tukey p<0.05).

La claritromicina puede inhibir la síntesis de la proteína D1; factor importante para mantener la estabilidad de Q<sub>B</sub> proteína en el centro de reacción del PSII (Strasser *et al.*, 1997); por lo que la falta de centros de reacción del PSII también puede afectar al CLO, provocando una mayor reducción en la fase fotoquímica o el lado donador del fotosistema II, que en el lado aceptor del fotosistema II (Liu *et al.*, 2011a); este efecto es debido a que probablemente la claritromicina inhibe subunidades proteínicas sintetizadas en el cloroplasto.



## F. Estructura y función de los centros de reacción del fotosistema II

El PSII y el PSI son complejos multiproteínicos que se localizan principalmente en las membranas gránales, consisten de un complejo cosechador de luz (LHCII por sus siglas en inglés) y un centro de reacción (RC por sus siglas en inglés). Los complejos proteínicos cosechadores de luz contienen cientos de moléculas pigmentarias esencialmente clorofila *a*, *b* y carotenoides. El sistema antena se compone de una antena interna, situada cerca del RC y el sistema antena periférica (Tóth, 2006).

Los pigmentos que absorben la luz se localizan en proteínas de membrana las cuales se asocian formando unidades funcionales llamadas fotosistemas en donde la energía de excitación es transferida hasta ser atrapada en un lugar especializado de la unidad para su conversión fotoquímica. Este lugar es denominado centro de reacción, el cual está formado por un complejo de proteínas sobre la membrana, moléculas especializadas en el transporte de electrones y moléculas de Clorofila *a* que se encuentran en un ambiente especial y forman el centro reactivo. La mayor parte de la unidad fotosintética sirve como colector de energía electromagnética, los pigmentos constituyen a dicha unidad y se asocian en grandes complejos con proteínas y se les suele denominar complejos antena (Montoya, 1993).

El centro de reacción del PSII es un núcleo heterodimero que está formado por dos subunidades proteínicas; D1 (PsbA) y D2 (PsbD); cuatro moléculas de clorofila son localizadas en el centro de las subunidades D1 y D2. Dos de las moléculas de clorofila están situadas entre las subunidades D1 y D2 (CP43 y CP47), mientras que las otras dos moléculas (clorofila accesoria) se encuentran situadas simétricamente sobre las mismas subunidades (LHCII). Una molécula de feofitina (Pheo) está unida a la proteína D1 y alguna otra está unida a la proteína D2. La quinona primaria ( $Q_A$ ) es localizada sobre la proteína D2 mientras que la quinona secundaria es localizada sobre la proteína D1 (Fig.20) (Tóth, 2006).

Particularmente, el lado donador del PSII incluye (1) dos residuos de tirosina ( $Y_z$ ,  $Y_D$ ) localizadas sobre las proteínas D1 y D2 respectivamente, (2) tres proteínas extrínsecas que protegen el núcleo de manganeso desde el lumen. En general el complejo liberador de oxígeno (CLO) se refiere al núcleo de manganeso. Otros componentes del centro de reacción del PSII son el Cyt  $b_{559}$ , a dos subunidades (PsbE y PsbF) proteínas hemo y varias subunidades intrínsecas de membrana (Tóth *et al*, 2007) (Fig. 20).

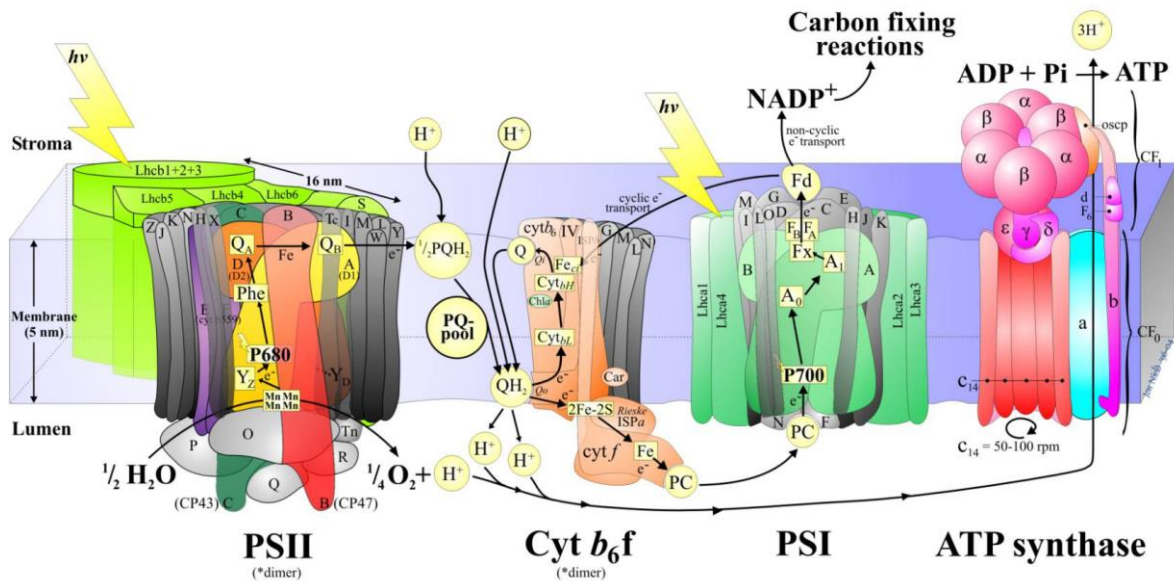


Figura 20: Modelo esquemático de la cadena de transporte electrónico fotosintético incluyendo información sobre la organización estructural de los complejos de proteínas que participan en el transporte de protones y electrones dentro de la membrana tilacoidal. (Tomado de Tóth, 2006)

El primer paso en la conversión de energía luminosa en energía química es la absorción de fotones por el sistema antena. Esta absorción se produce en femtosegundos y causa una transición del estado fundamental ( $S_0$ ) al estado excitado ( $S_1$ ,  $S_2$  y  $S_3$ ). Una parte de la energía de excitación se pierde en forma de calor durante la transición a niveles inferiores, las moléculas pueden volver a partir de un subnivel  $S_1$  a cualquier subnivel  $S_0$  por disipación de calor o por emisión de luz (fluorescencia).

Las fases de transferencia de energía entre clorofilas a vecinas son detectables con el método de fluorescencia. Utilizando la “Teoría de flujos de energía en biomembranas” y los valores experimentales de la cinética de fluorescencia O-K-J-I-P, se han derivado los flujos de energía por centro de reacción o por sección transversal y las relaciones de flujo o relación de rendimiento. Sus valores en cualquier instante son una expresión de la función del sistema (Gonzales *et al.*, 2008)

ABS = El flujo fotónico absorbido por las moléculas de pigmentos de los complejos antena.

TR = El flujo de energía de excitación el cual alcanza el centro de reacción y ahí queda atrapada.

ET = El flujo de energía atrapada que es convertida a energía redox por transporte de electrones después de  $Q_A^-$ .

DI = Parte de la energía absorbida que es disipada como calor y fluorescencia.

RE = Flujo utilizado para la reducción de los aceptores finales del lado aceptor del fotosistema I (PSI)

El análisis de la cinética de la fluorescencia de la clorofila a del PSII a través de la prueba OKJIP (Strasser y Strasser, 1995) se puede modelar estableciendo el destino del flujo de energía luminosa atravesando el PSII (Fig. 21).

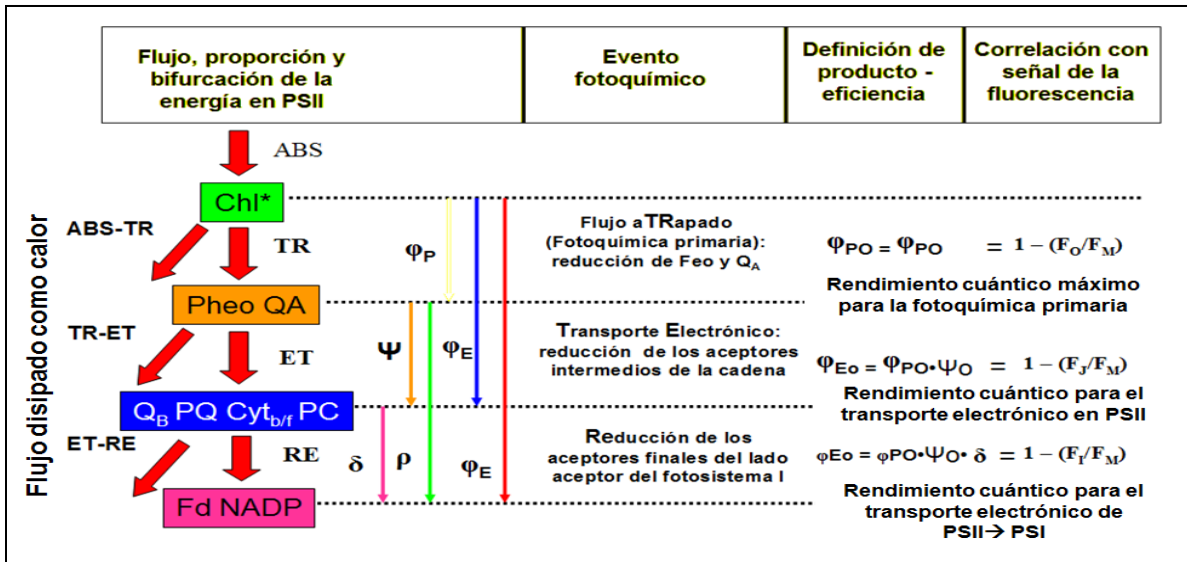


Figura 21. Modelo simplificado de los flujos de energía en el aparato fotosintético a través del PSII, ABS se refiere a el flujo de fotones absorbido por los pigmentos de la antena (Chl\*) Parte de esta energía de excitación se disipa como calor y en menor grado como emisión de fluorescencia; TR se refiere al flujo atrapado al centro de reacción y es convertido en energía redox, reduciendo al aceptor de electrones Q<sub>A</sub> a Q<sub>A</sub><sup>-</sup> (Prueba O-K-J-I-P)

Como se puede observar en la figura 22, la fracción de centros de reacción activos del PSII [ $RC/ABS = (M_o/V_j)/(1-F_o/F_M)$ ] disminuye significativamente ( $p < 0.05$ ) conforme aumenta la concentración de claritromicina, los números de centros de reacción cerrados aumenta lo que implica una menor captación de energía necesaria para llevar a cabo la fotoquímica primaria, (por una probable alteración de los centros de reacción). El efecto producido por la concentración más elevada de claritromicina ( $3 \text{ mg.L}^{-1}$ ) afecta 74.27% al número de centros de reacción activos con respecto al control.

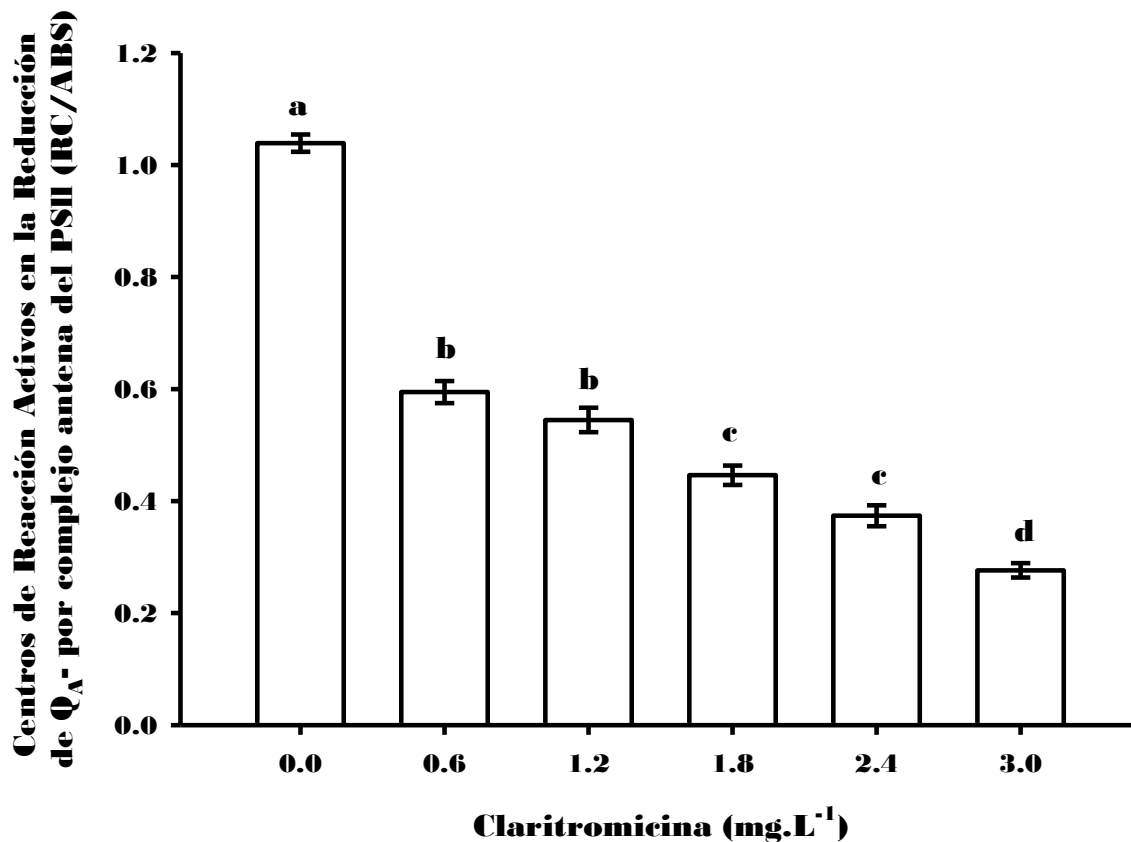


Figura 22: Efecto de la claritromicina sobre los centros de reacción activos por complejo antena del PSII (Reducción de Q<sub>A</sub> por RC por antena) medido en *C. vulgaris* durante 72 horas de exposición. (n=8) (Letras diferentes indican diferencias significativas según la prueba de Tukey p<0.05).

El decaimiento en el número de centros de reacción activo pudiera estar relacionado con el cambio conformacional del PSII, debido a la incorrecta o disminuida síntesis de la proteína D1 o el complejo liberador de oxígeno, producto de la exposición frente a claritromicina, como fue observado por Askmann y Tukaj 2008 y Gómez 2012.

Por otro lado, la figura 23 muestra que el flujo de absorción de los complejos antena por centro de reacción del PSII [ $ABS/RC=(M_0 \cdot (1/V_j)) \cdot (1/\phi P_0)$ ] se incrementó sustancialmente conforme aumento la concentración de claritromicina en el medio de cultivo, particularmente el tratamiento (3 mg.L<sup>-1</sup>) aumentó 3.89 veces el flujo de absorción con respecto al control encontrando diferencias significativas (p<0.05),

bajo estas circunstancias, los mecanismos de absorción y utilización de energía fotónica deben ser balanceados debido a que el exceso de luz provocaría daños fotooxidativos.

El parámetro ABS/RC representa el número total de fotones absorbidos por las moléculas de clorofila de todos los centros de reacción, dividido por el número total de centros de reacción activos (Mathur *et al.*, 2011). Un incremento en el valor de ABS/RC indica que los centros de reacción se inactivan, por una alteración estructural en el PSII y son incapaces de reducir  $Q_A$  o por un aumento en el tamaño de la antena (LHCII), es decir que la antena que suministra energía de excitación a los RC ha aumentado de tamaño.

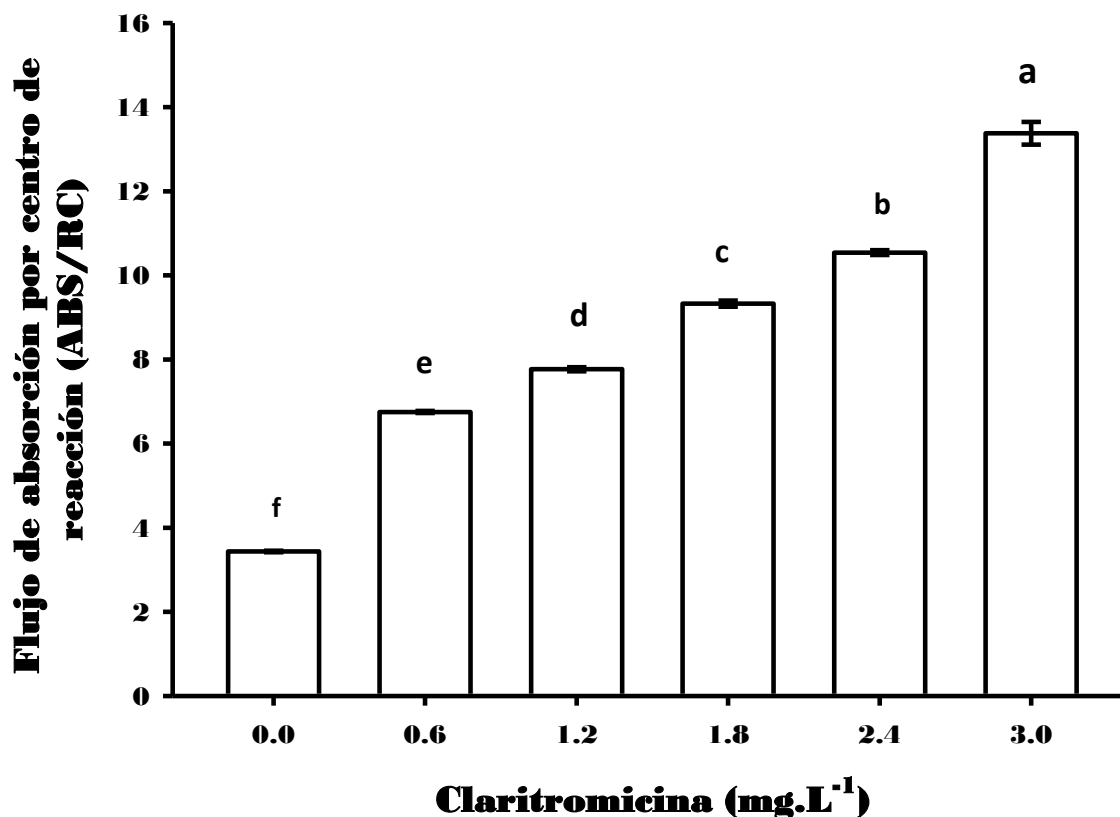


Figura 23: Flujo de excitones absorbidos por centro de reacción del PSII (ABS/RC) medidos en *C. vulgaris* expuesta a claritromicina durante 72 horas (refleja la medida en promedio del tamaño de la antena). (n=8). (Letras diferentes indican diferencias significativas según la prueba de Tukey  $p < 0.05$ ).

En el primer caso ( $TR_0/RC$ ) no podría verse afectado (ya que solo se refiere a los centros de reacción activos), donde una fracción de los centros de reacción del PSII han sido desactivados y son incapaces de reducir  $Q_A$ ; mientras que el rendimiento cuántico máximo para la fotoquímica primaria del PSII ( $\phi P_0$ ) disminuiría proporcional al RC [(capacidad de atrapar energía de excitación para reducir  $Q_A$ ) ( $TR_0/RC$ )], (Yusuful *et al.*, 2010).

En el segundo supuesto, es debido a un aumento en el tamaño de la antena donde la eficiencia cuántica máxima para la fotoquímica primaria no es afectada y la capacidad de atrapar energía de excitación para reducir  $Q_A$  ( $TR_0/RC$ ) aumentaría de forma similar al aumento de la absorción por centro de reacción ( $ABS/RC$ ).

Nuestros resultados indican que el aumento de la absorción por centro de reacción del PSII, se debe a una desactivación de los centros de reacción, ya que  $\phi P_0$  disminuye y la capacidad de atrapamiento de la energía de excitación para reducir  $Q_A$ , no aumenta de manera proporcional a la  $ABS/RC$ , ya que no existe diferencias entre los distintos tratamientos al menos en el sentido estadístico. En concordancia a nuestros resultados Liu *et al.* (2011a), demostraron que la eritromicina induce significativamente a un descenso en el número de centros de reacción activos ( $RC/ABS$ ) y a un aumento en el flujo de excitones absorbidos por centro de reacción ( $ABS/RC$ ).

La figura 24 muestra que el flujo de atrapamiento por centro de reacción ( $TR_0/RC$ ) aumentó significativamente ( $p < 0.05$ ), la última concentración probada se incrementó 40.40% con respecto al control, sin embargo a partir de la segunda concentración probada no existen diferencias estadísticamente significativas, una posible explicación es que al disminuir los centros de reacción activos aumenta la energía que se distribuye sobre los centros de reacción que permanecen funcionales.

El flujo de energía  $TR_0/RC$  expresa la tasa específica por la que un electrón atrapado por un centro de reacción abierto permite la reducción de  $Q_A$  a  $Q_{A^-}$  (Mathur *et al.*, 2011). Esta connotación representa la fracción de densidad de flujo fotónico absorbido usada para la separación de carga y la estabilización de los centros de reacción como  $P680^+ Q_A^-$  (Stirbert y Govindjje, 2011). También corresponde a la donación de electrones del complejo liberador de oxígeno del PSII.

Esta evidencia en combinación con los resultados anteriores corrobora que la actividad del CLO es inhibido; se propone que el efecto de la claritromicina, produce una inhibición sobre el flujo de electrones entre  $Q_A$  y  $Q_B$ , sobre todo en el lado donador del PSII, pero no afecta la función de la antena.

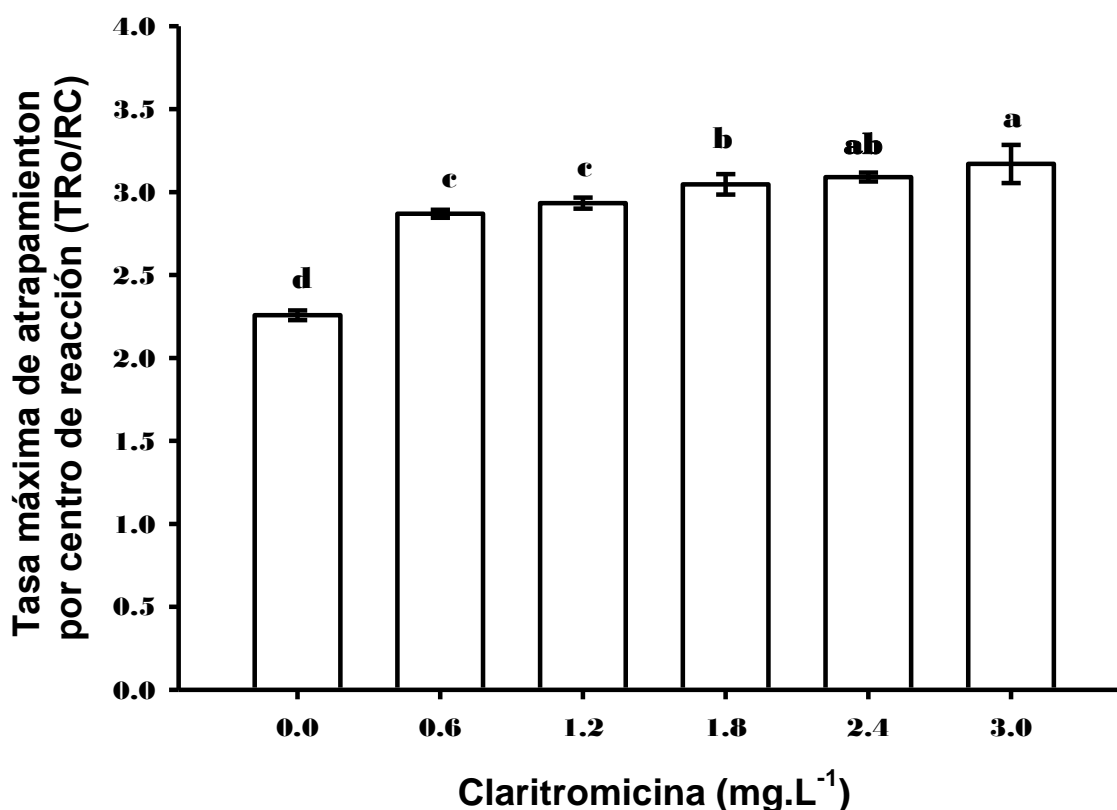


Figura 24: Flujo de energía atrapada por centro de reacción del PSII ( $TR_0/RC$ ) (máxima tasa de reducción de  $Q_A$ ) medidos en *C. vulgaris* expuesta a claritromicina durante 72 horas. (n=8) (Letras diferentes indican diferencias significativas según la prueba de Tukey  $p<0.05$ ).



Liu *et al.* (2011a), observaron un incremento en  $TR_0/RC$  significativo después de la exposición a la eritromicina, sin embargo nuestros resultados de  $TR_0/RC$  no se relaciona directamente con el aumento en  $ABS/RC$ , esto significa que todavía la antena absorbía energía fotónica pero no alimenta al centro de reacción activo, por lo que disipó su energía de excitación a través de calor ( $DI_0/RC$ ) (Ver figura 26).

El flujo de transporte de electrones más allá de  $Q_A$  ( $ET_0/RC$ ), aumentó significativamente ( $p < 0.05$ ) el último tratamiento probado ( $3 \text{ mg.L}^{-1}$ ) incrementó 96.18% comparado con el control (Fig. 25), (este efecto se puede apreciar en la figura 16, sobre las fases J-P). Este parámetro representa de manera indirecta la reoxidación de  $Q_A$  vía transporte de electrones en un centro de reacción activo, por lo que estos resultados indican que aun cuando la capacidad de atrapar la energía aumenta significativamente ( $p < 0.05$ ) hasta un 40.40% (Fig. 24), la capacidad de mover electrones después de  $Q_A$  aumenta hasta un 39.64% comparado con el control (Fig. 28).

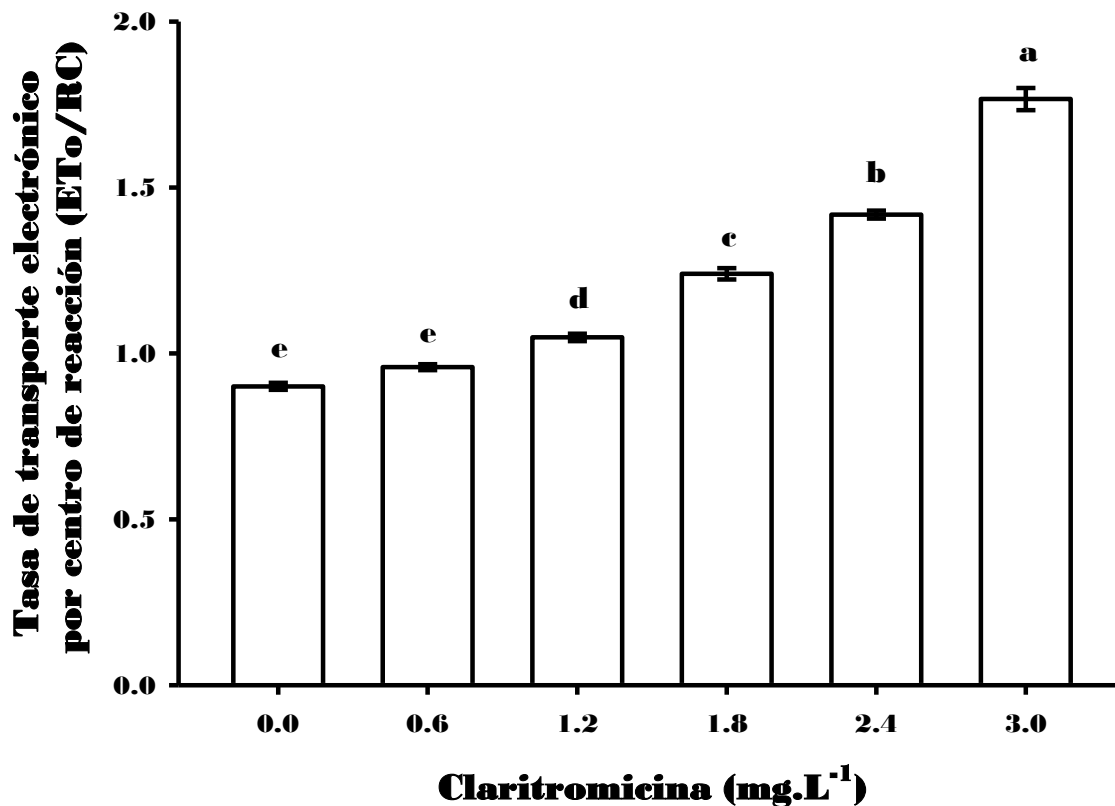


Figura 25: Flujo del transporte de electrones por centro de reacción del PSII ( $ET_0/RC$ ) medidos en *C. vulgaris* expuesta a claritromicina durante 72 horas. ( $n=8$ ) (Letras diferentes indican diferencias significativas según la prueba de Tukey  $p<0.05$ ).

Varios investigadores han demostrado que una serie de centros de reacción del PSII, aunque fotoquímicamente competentes, no son capaces de transferir electrones de manera eficiente del aceptor de electrones ( $Q_{A-}$ ) al aceptor secundario de electrones ( $Q_B$ ) (Mathur *et al.*, 2011); sin embargo, nuestros resultados demuestran que conforme aumenta la concentración de la claritromicina, esta provoca una mayor estimulación sobre el flujo de electrones por centro de reacción sobre el lado aceptor del PSI. Cuando la energía absorbida es mucho mayor que la eficiencia con la que se utiliza como sucedió en el presente trabajo, la sobreexcitación del PSII debe ser liberada por la vía no fotoquímica para evitar daño en los fotosistemas (Aksmann y Tukaj, 2008), lo cual concuerda con nuestros resultados.

En la figura 26 observamos que la disipación eficaz de un centro de reacción activo ( $DI_0/RC$ ) del PSII se incrementó significativamente ( $p < 0.05$ ) por la exposición a la claritromicina, esto concuerda con los resultados observados en el tamaño efectivo de la antena por RC ( $ABS/RC$ ) y al flujo de energía atrapada por RC ( $TR_0/RC$ ). El flujo de energía disipada ( $DI_0/RC$ ) aumento 8.6 veces en la máxima concentración probada ( $3 \text{ mg.L}^{-1}$ ) con respecto al control. Debido a la inhibición de la energía requerida para la fotoquímica primaria y al aumento en el transporte de electrones, una gran cantidad de la energía fotónica superflua puede ser liberada sólo por el camino de la disipación de calor ( $DI_0/RC$ ).

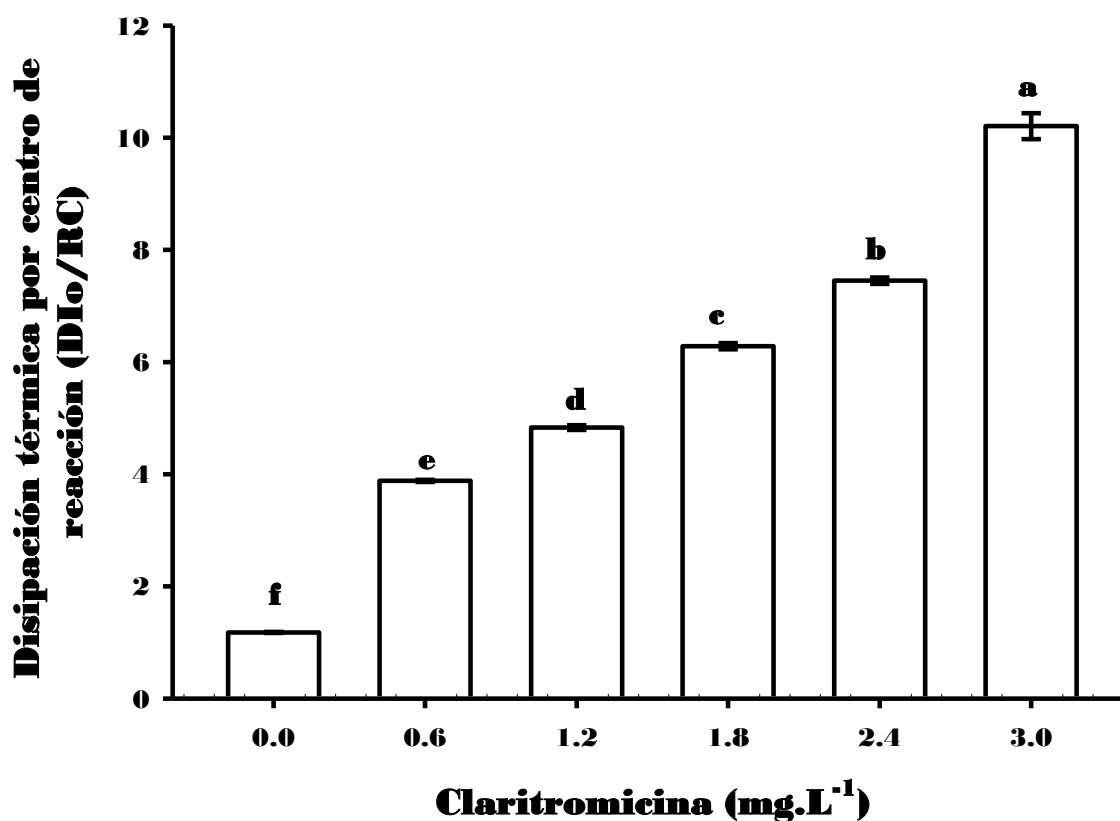


Figura 26: Flujo de energía disipada por centro de reacción ( $DI_0/RC$ ) activo medidos en *C. vulgaris* expuesta a claritromicina durante 72 horas. ( $n=8$ ) (Letras diferentes indican diferencias significativas según la prueba de Tukey  $p < 0.05$ ).

Perrón *et al.*, (2012) encontraron que el flujo de energía de disipación eficaz por centro de reacción  $[(DI_0/RC)=(ABS/RC)-(TR_0/RC)]$  se incrementó significativamente ( $p<0.05$ ) en concordancia a lo observado en el tamaño efectivo de la antena por centro de reacción (ABS/RC). Sin embargo es necesario corroborar esta aseveración ya que se ha comprobado que macrólidos como la eritromicina tiene la capacidad de inhibir el ciclo de glutatión-ascorbato y componentes en el ciclo de las xantofilas en *Pseudokirchneriella subcapitata* (Nie *et al.*, 2013), mecanismo requerido para la disipación de energía a través de calor.

### **G. Actividad y eficiencia cuántica del fotosistema II**

Los parámetros  $F_0$  y  $F_m$  del análisis de fluorescencia permiten calcular la eficiencia cuántica máxima del FSII, que está dada por la relación  $[F_v/F_m=(F_m-F_0)/F_m=\phi P_0]$ . La reducción en el rendimiento máximo para la fotoquímica primaria en PSII (Tóth *et al.*, 2002) se debe a que el valor de la fluorescencia mínima ( $F_0$ ) aumentó con respecto a la máxima ( $F_m$ ), por lo cual la relación  $F_m/F_0$  disminuyó.

La eficiencia cuántica con la que la luz es atrapada por los centros de reacción y es utilizada para reducir  $Q_A$   $[(TR_0/ABS)=(F_v/F_m)=(\Phi P_0)]$ , se reduce significativamente ( $p<0.05$ ), la concentración más elevada ( $3 \text{ mg.L}^{-1}$ ) marco una inhibición del 63.89% con respecto al control (Fig. 27).

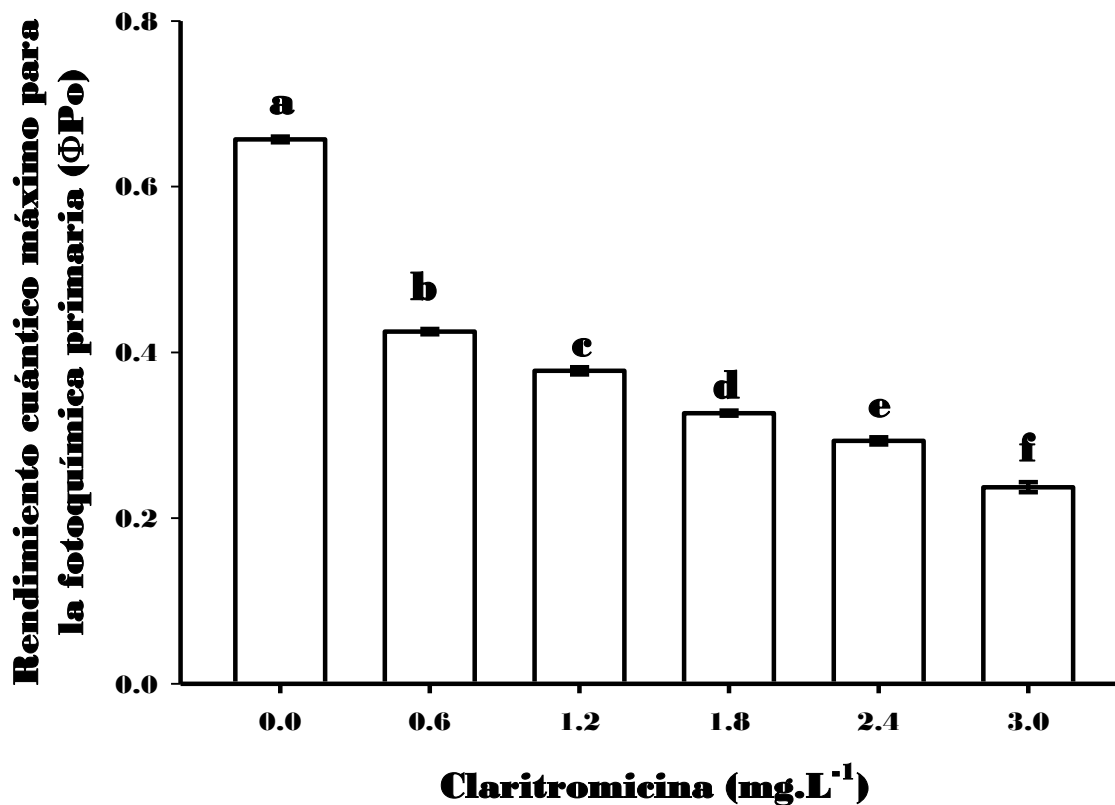


Figura 27: Rendimiento cuántico para la fotoquímica primaria ( $\Phi P_0$ ) medidos en *C. vulgaris* expuesta a claritromicina durante 72 horas. (n=8) (Letras diferentes indican diferencias significativas según la prueba de Tukey  $p < 0.05$ ).

La reducción en la eficiencia cuántica máxima para la fotoquímica primaria ( $\Phi P_0$ ) por efecto de la eritromicina, ha sido reportada en *Selenastrum capricornutum* (Liu *et al.*, 2011a), este efecto sugiere que la actividad de centros de reacción fue altamente sensible frente a la exposición a macrólidos como la eritromicina y claritromicina

Por otra parte, Gómez en 2012 observó que la estreptomicina inhibe el 65.62% de ( $\Phi P_0$ ), este efecto se produjo infiriendo que la estreptomicina interfiere con la maquinaria enzimática, probablemente afectando la síntesis y ensamblado de la proteínas estructurales como la proteína D1.

Debido a la falta de centros de reacción del PSII, el proceso principal de la fotosíntesis tal como la fotoquímica primaria puede ser inhibido por completo, lo que incluye la disminución de algunos parámetros incluyendo  $\Phi P_O$ . Como anteriormente se ha mencionado antibióticos macrólidos como la eritromicina y la claritromicina pueden inhibir la síntesis de la proteína D1, un importante factor para mantener la estabilidad de la proteína  $Q_B$  en los centro de reacción, cuya desestabilización conduce a una completa desactivación del PSII (Tóth *et al.*, 2002; Tóth, 2006).

La probabilidad de que un electrón se mueva más allá de  $Q_A$  ( $\Psi_o$ ) aumentó 39.64% en la máxima concentración probada de claritromicina (3 mg.L<sup>-1</sup>), sin embargo, descendió de manera significativa ( $p < 0.05$ ) 16.25% en el segundo tratamiento con respecto al control (Fig. 28).

La cinética de acumulación de  $Q_A$ - depende de la cinética de oxidación por la quinona secundaria de electrones ( $Q_B$ ) y de la entrada de electrones del lado donador del PSII; la figura 28 muestra que la eficiencia de que un electrón se mueva más allá de  $Q_A$  disminuye en los primeros tratamientos; sin embargo, el comportamiento tiende a aumentar a partir del tratamiento (2.4 mg.L<sup>-1</sup>) comparado con el control, este efecto implica que existe un déficit sobre el transporte de electrones más allá de  $Q_A$ , en los tratamientos 0.6 a 1.8 mg.L<sup>-1</sup>, no obstante en las concentraciones (2.4 y 3.0 mg.L<sup>-1</sup>) existe una mayor eficiencia de transporte de electrones más allá de  $Q_A$ , comparado con el control, donde el flujo de electrones es mayor inclusive que el control como lo demuestra la figura 25 ( $ET_o/RC$ ), probablemente promovido por un aumento en el transporte en PSI (Ver figura 30).

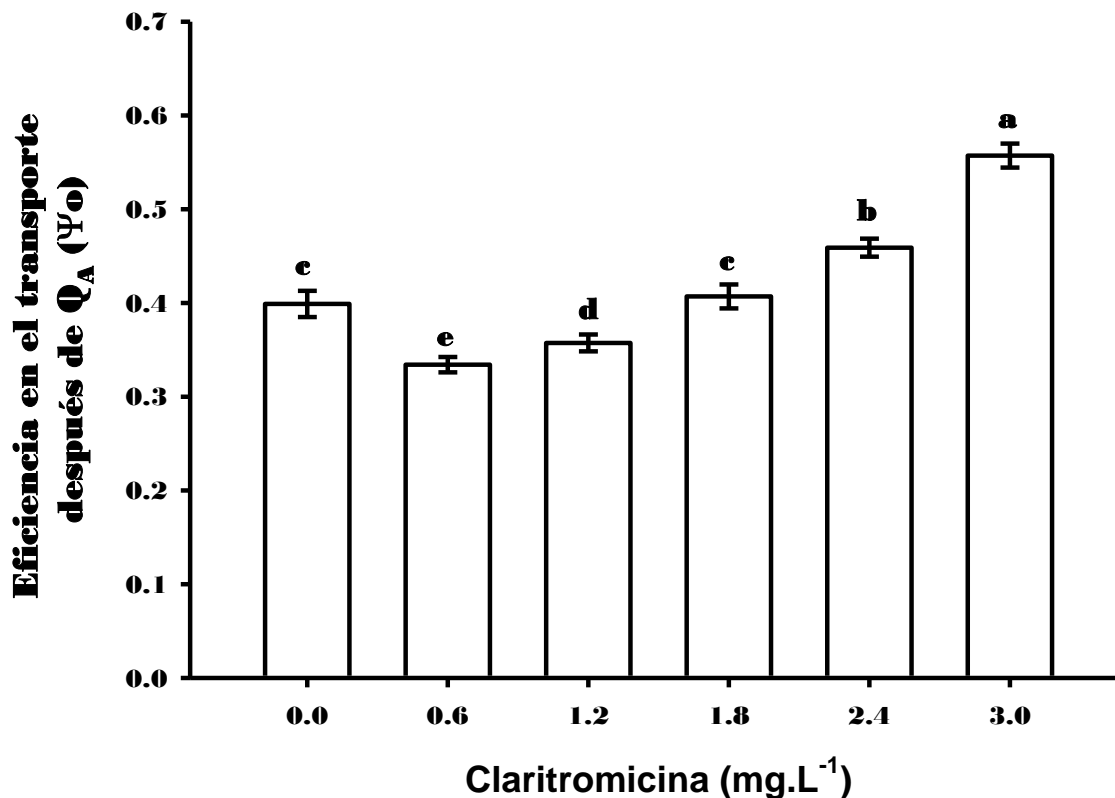


Figura 28: Probabilidad de que un electrón se mueva más allá de Q<sub>A</sub> (Ψ<sub>0</sub>) medidos en *C. vulgaris* expuesta a claritromicina durante 72 horas. (n=8) (Letras diferentes indican diferencias significativas según la prueba de Tukey p<0.05).

El rendimiento cuántico de transporte de electrones ( $\phi E_0$ ) = (ET<sub>0</sub>/ABS) es el producto entre el rendimiento cuántico máximo para la fotoquímica primaria ( $\phi P_0$ ) y la probabilidad que un electrón atrapado en el centro de reacción se mueva más allá de Q<sub>A</sub> (Ψ<sub>0</sub>). En los resultados de la figura 29 se puede observar una abrupta disminución de la eficiencia con la cual los electrones se mueven a través del PSII, los valores muestran que la energía atrapada por el centro de reacción y utilizada para realizar transporte electrónico disminuyó significativamente (p<0.05) por efecto de la claritromicina, en el caso del tratamiento (3.0 mg.L<sup>-1</sup>) cae abruptamente hasta 49.36% con respecto al control.

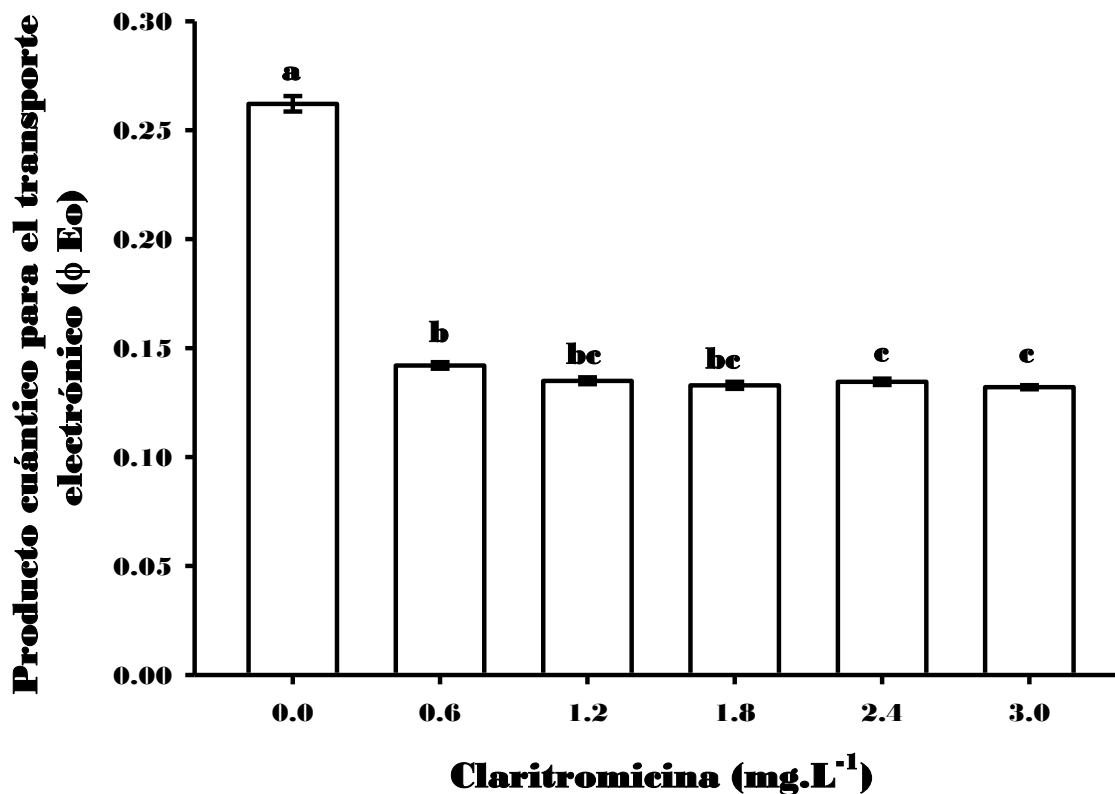


Figura 29: Rendimiento cuántico para el transporte de electrones (ET) ( $\Phi E_0$ ) medidos en *C. vulgaris* expuesta a claritromicina durante 72 horas. (n=8) (Letras diferentes indican diferencias significativas según la prueba de Tukey  $p < 0.05$ ).

Los macrólidos pueden inhibir la síntesis de proteínas D1 y D2 sintetizadas por genes del cloroplasto, además del complejo  $cytb_6-f$ , proteínas de la membrana del tilacoide en algas, estas acciones pueden afectar seriamente el transporte electrónico del PSII al PSI y reducir el tamaño de los receptores en el lado aceptor del PSI. Nuestros resultados indican que el lado donador del PSII, es decir:  $CLO \rightarrow P680 \rightarrow Feo \rightarrow Q_A$ , es más sensible al efecto del antibiótico, que el lado aceptor, es decir,  $Q_B \rightarrow PQ \rightarrow Cit_{b6/f}$ .



**I. Actividad y eficiencia cuántica del transporte electrónico en los acarreadores intermedios ( $Q_B \rightarrow PQ \rightarrow \text{Cit}_{b6/f} \rightarrow PC$ ) y los acarreadores del lado aceptor del fotosistema I ( $A_0 \rightarrow A_1 \rightarrow F_X \rightarrow F_A/F_B \rightarrow Fd \rightarrow FNR \rightarrow$ ).**

Con base a los resultados experimentales que se muestran en la fase I-J del análisis de fluorescencia en la prueba O-K-J-I-P, se ha propuesto una expresión que permite visualizar un flujo de energía específico de transferencia de electrones desde la plastoquinona (PQ) hasta el PSI,  $[\text{RE}_1/\text{RC} = (\text{TR}_0/\text{RC}) * (1 - V_1) = (M_0/V_J) * (1 - V_1)$  (Stirbet y Govindjee, 2011).

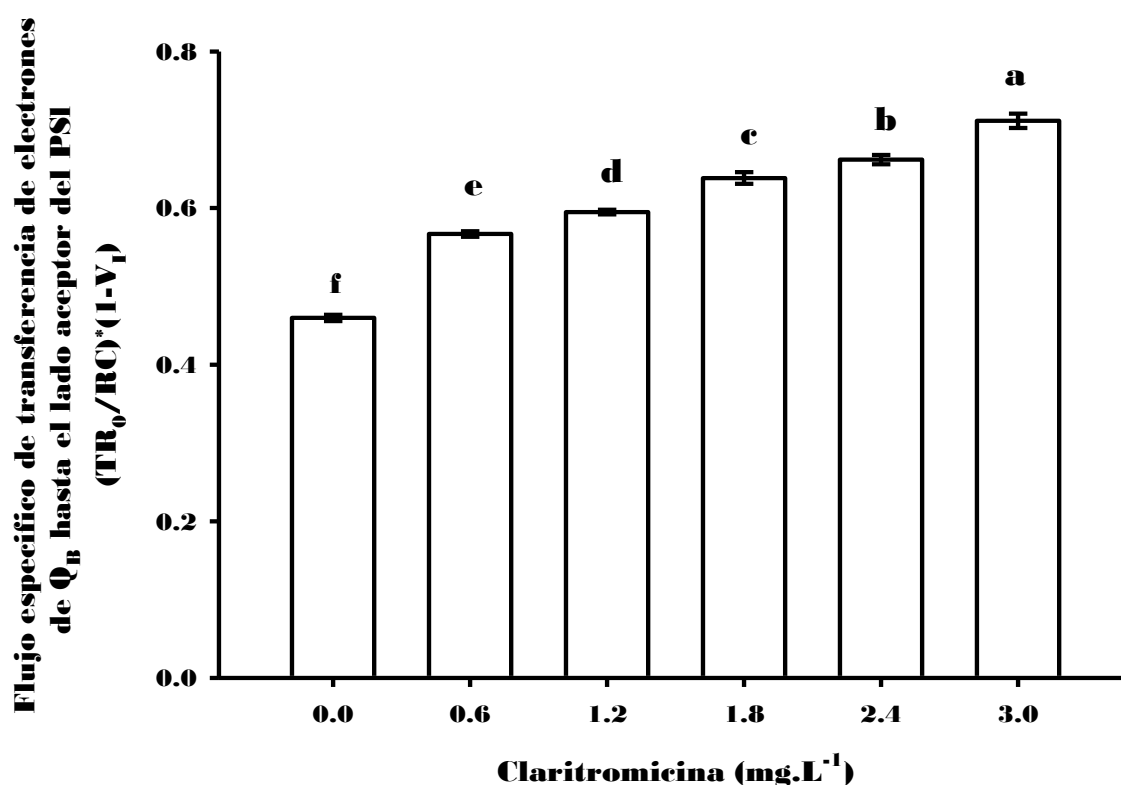


Figura 30: Flujo específico de transferencia para el transporte de electrones en los acarreadores intermedios y los acarreadores finales del lado aceptor del fotosistema II  $(\text{TR}_0/\text{RC}) * (1 - V_1)$  medidos en *C. vulgaris* expuesta a claritromicina durante 72 horas. (n=8) (Letras diferentes indican diferencias significativas según la prueba de Tukey  $p < 0.05$ ).

De lo anterior, observamos que cuando aumenta la concentración de claritromicina hay una mayor transferencia de electrones de  $Q_B$  hacia el lado aceptor del PSI por parte de los acarreadores intermedios ( $Q_B \rightarrow PQ \rightarrow \text{Cit}_{b6/f} \rightarrow PC$ ) para reducir los aceptores finales del fotosistema I. El flujo específico de

transferencia de electrones desde  $Q_B$  hasta el lado aceptor del PSI aumento 54.44% en la concentración más alta de claritromicina ( $3 \text{ mg.L}^{-1}$ ) con respecto al control (Fig. 30).

Por otro lado, en la figura 31 se muestra que cuando aumenta la concentración de claritromicina hay una mayor eficiencia con la que un electrón de  $Q_B$  es transferido al lado aceptor del PSI por parte de los acarreadores intermedios ( $Q_B \rightarrow PQ \rightarrow \text{Cit}_{b6/f} \rightarrow PC$ ) para reducir los aceptores finales del fotosistema I [ $\delta R_0 = (1-V_I)/(1-V_J)$ ] teniéndose una estimulación significativa ( $p < 0.05$ ) del 91.50% en la máxima concentración probada ( $3 \text{ mg.L}^{-1}$ ) con respecto al control. Este resultado corrobora la hipótesis de que la claritromicina activa el flujo cíclico de electrones, efecto que promueve la estimulación en la reducción de los aceptores de electrones del PSI.

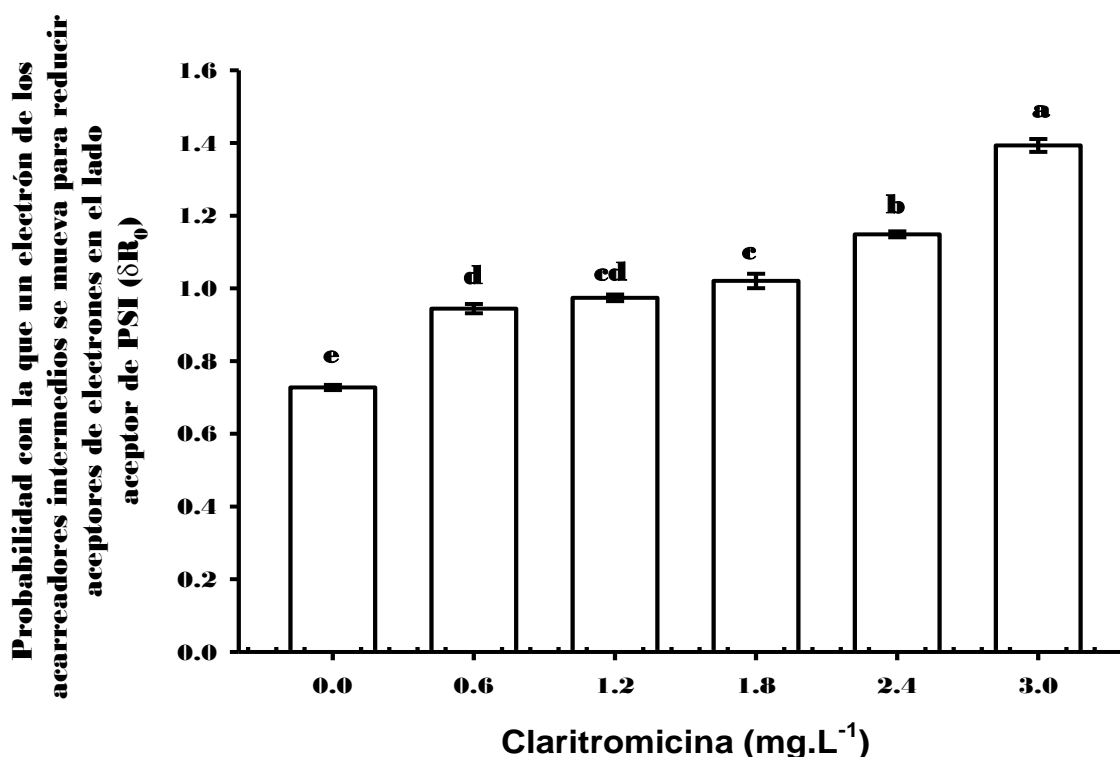


Figura 31: Probabilidad con la que un electrón proveniente de los acarreadores intermedios se mueva para reducir los acarreadores finales del lado aceptor del fotosistema II ( $\delta R_0$ ) medidos en *C. vulgaris* expuesta a claritromicina durante 72 horas. ( $n=8$ ) (Letras diferentes indican diferencias significativas según la prueba de Tukey  $p < 0.05$ ).

En la figura 31 se observa la eficiencia cuántica para la reducción de los últimos aceptores del PSI ( $\Phi_{Ro}$ ), es el resultado del producto de la eficiencia cuántica máxima para la fotoquímica primaria ( $\Phi_{Po}$ ), la probabilidad de que un electrón se mueva más allá de  $Q_A^-$  ( $\Psi_{Eo}$ ) y la probabilidad de que un electrón proveniente de los acarreadores intermedios reduzca los acarreadores del lado aceptor de PSI ( $\delta R_o$ ).

Aun cuando los valores de  $\delta R_o$  se incrementan significativamente (Fig. 31), la eficiencia con la que la luz es atrapada disminuye y la probabilidad de que un electrón se mueva más allá de  $Q_A$  aumenta significativamente (Figs. 27 y 28); por lo cual, el resultado en  $\Phi_{Ro}$  es descendente en los primeros tratamientos, y aumenta en la concentración 3.0 mg.L<sup>-1</sup>; sin embargo, no existen diferencias significativas entre esta concentración y el control. Esto significa que a bajas concentraciones de claritromicina provoca un menor rendimiento para reducir los últimos aceptores del PSI; no obstante, conforme aumenta la concentración del macrólido tiende a restaurarse el transporte electrónico de los acarreadores intermedios hacia los aceptores finales del PSI.

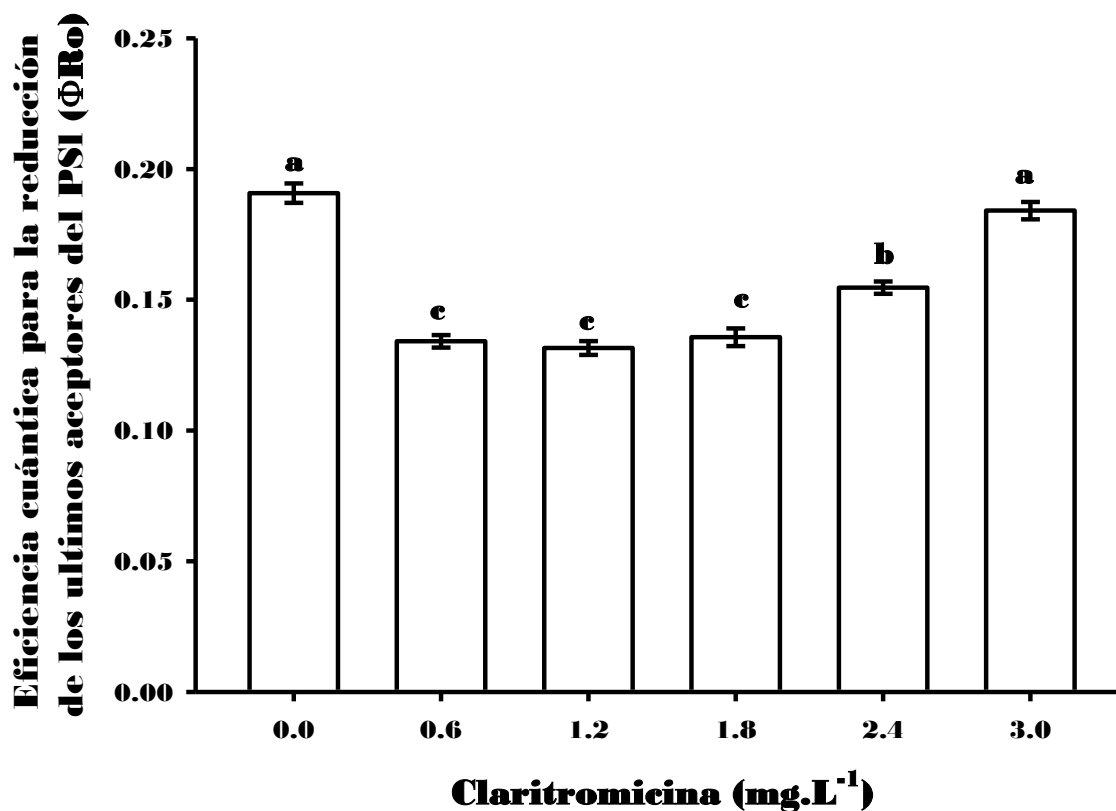


Figura 32: Eficiencia cuántica para el transporte de electrónico en los acarreadores intermedios y los acarreadores finales del lado aceptor del fotosistema II ( $\delta R_0$ ) medidos en *C. vulgaris* expuesta a claritromicina. (n=8) (Letras diferentes indican diferencias significativas según la prueba de Tukey  $p < 0.05$ ).

Gómez en 2012 demostró que la estreptomycina provoca un mayor flujo de electrones por parte de los acarreadores intermedios para reducir los aceptores finales del PSI. Este resultado corrobora que antibióticos inhibidores de síntesis de proteínas provocan un aumento entre las fases I-P, el cual se relaciona con el aumento en la reducción del PSI, activando el mecanismo de drenado de los electrones atascados en la parte donadora del PSII hacia el PSI.

Existen mecanismos en condiciones de sobre excitación y reducción del PSII, que podrían ser utilizados para reducir esta presión del sistema, el cual consiste en aumentar el flujo de electrones a nivel del PSI de modo que los electrones acumulados en PSII son rápidamente drenados hacia el PSI (Takahashi *et al.*, 2009).

Nuestros resultados indican que a causa de una reducción en la cooperatividad entre los centros de reacción del PSII, así como el número centros activos de los mismos, la energía de excitación fue canalizada a los centros de reacción activos por lo cual se encontró mayor absorción y atrapamiento de energía de excitación por centro de reacción, esto pudiera causar daño de los centros de reacción. Los cuales al no poder canalizar dicha energía al centro de reacción, funcionan como disipadores de calor aumentando la energía liberada por rutas no fotoquímicas (NPQ).

Ésta presión sobre el transporte electrónico pudiera producirse por un incremento en la formación de ROS así como de las enzimas responsables de degradarlas (reacción de Mehler). Para balancear la energía en el aparato fotosintético, se encontró un incremento en la reducción de los últimos aceptores del PSI, posiblemente por un aumento en el flujo cíclico o un aumento del flujo electrónico hacia rutas alternativas.

Okada *et al.* (1991), demostraron que el cloranfenicol (antibiótico inhibidor de síntesis de proteínas) afecta directamente el transporte fotosintético de electrones en hojas de *Oryza sativa* (arroz) adaptadas a la oscuridad; sin embargo, no se obtuvo evidencia que indique que el cloranfenicol inhiba la transferencia de electrones del PSII hacia el PSI, ya que los experimentos indicaron que este antibiótico mejora el transporte de electrones a través del PSI y aumenta la tasa de consumo de oxígeno conforme aumenta la concentración del antibiótico, evidenciando que el cloranfenicol en este caso estimula la recepción de electrones.

## **J. Índice de rendimiento total.**

El índice de rendimiento total, es un factor multiparamétrico, el cual nos permite evaluar de manera conjunta la actividad total de la cadena transportadora de electrones fotosintética. Este índice está formado de cuatro expresiones independientes que constituyen las fuerzas impulsoras de la fotosíntesis: (1) el transporte de electrones después de  $Q_A$  [ $\Psi_0/(1-\Psi_0)$ ], (2) la concentración de

centros de reacción activos por clorofila [RC/ABS], (3) el máximo rendimiento cuántico para la fotoquímica primaria ( $\phi Po/(1-\phi Po)$ ), y (4) la probabilidad de reducir los aceptores finales del PSI ( $\Phi Ro/1-\Phi Ro$ ) (Liu *et al.*, 2011a; Gómez, 2012).

Los cambios de los diferentes componentes de  $PI_{Total}$  (RC/ABS),  $[\Psi o/(1-\Psi o)]$ , y  $(\phi Po/(1-\phi Po))$  indicaron que *C. vulgaris* es sensible a los cambios en las propiedades de la antena, la eficiencia de atrapamiento y transporte electrónico después de  $Q_A$  así como en la reducción de los aceptores finales del PSI, al final de la cadena transportadora de electrones frente a la exposición a claritromicina.

El índice de rendimiento total disminuyó significativamente ( $p < 0.05$ ) conforme aumentó la concentración de claritromicina decreciendo 92.37% en el último tratamiento probado ( $3 \text{ mg.L}^{-1}$ ) con respecto del control (Fig. 33).

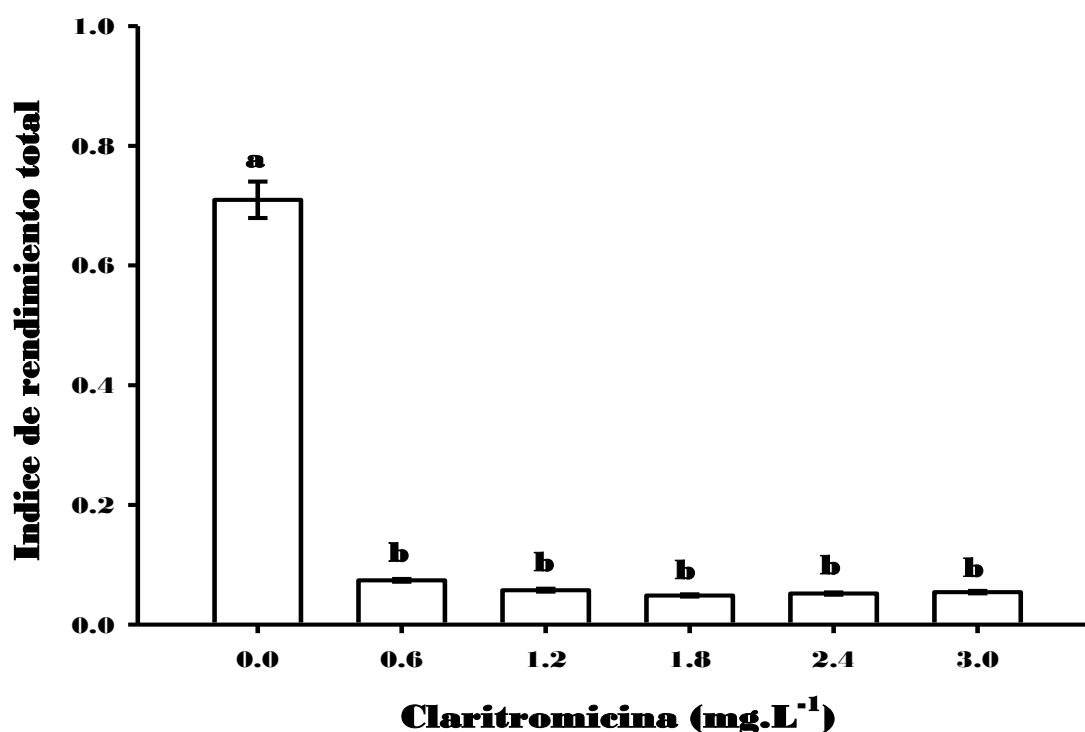


Figura 33: Índice de Rendimiento ( $PI_{TOTAL}$ ) medidos en *C. vulgaris* expuesta a claritromicina durante 72 horas. (n=8) (Letras diferentes indican diferencias significativas según la prueba de Tukey  $p < 0.05$ ).

En estudios previos, se ha demostrado que la eritromicina ( $0.3 \text{ mg.L}^{-1}$ ) desciende considerablemente tres de los componentes del Índice de Rendimiento  $[(RC/ABS)$ ,  $[\Psi_o/(1-\Psi_o)]$ , y  $(\phi P_o/(1-\phi P_o)]$  en especies de *Selenastrum capricornutum* sugiriendo que el macrólido causa efectos adversos en los centros de reacción del PSII, particularmente en el transporte de electrones más allá de  $Q_A$ , afectando finalmente el  $PI_{TOTAL}$  (Liu *et al*, 2011a).

Gómez en 2012, demostró que la estreptomina inhibe significativamente el índice de rendimiento afectando principalmente al rendimiento cuántico para la fotoquímica primaria ( $\phi P_o$ ), sin embargo los otros componentes también fueron inhibidos a causa del antibiótico.

## VIII. Conclusiones

El crecimiento celular, la concentración volumétrica de pigmentos fotosintéticos y la actividad fotosintética de *Chlorella vulgaris* pueden ser inhibidos por los mecanismos de acción de la claritromicina, debido a que este macrólido tiene la habilidad de inhibir proteínas del cloroplasto a nivel 50S ribosomal; a pesar que gran parte del ensamblaje proteínico es realizado por genes nucleares, la participación de genes cloroplásticos es esencial para la estructuración y funcionamiento de los complejos proteínicos, los cuales son necesarios para llevar a cabo la fotosíntesis. Por lo que la actividad inhibitoria de la claritromicina repercute principalmente en la actividad cloroplástica y no en la expresión genética nuclear.

La presente investigación demostró que la claritromicina tiene la capacidad para inhibir la tasa de crecimiento celular, inhibir la cantidad volumétrica de pigmentos fotosintéticos y alterar diferentes fases del metabolismo fotosintético de *Chlorella vulgaris*. Muchos de los procesos fisiológicos relacionados con la fotosíntesis: la fotoquímica primaria, el transporte electrónico y la liberación de oxígeno pueden ser inhibidos por la exposición a claritromicina.

Los resultados en la prueba O-K-J-I-P muestran que al aumentar la concentración de claritromicina sobre el medio de cultivo, el tamaño efectivo de la antena por centro de reacción (ABS/RC) aumentó, lo que probablemente provoca un incremento gradual en la probabilidad de que un exciton atrapado mueva un electrón en la cadena de transporte de electrones ( $ET_0/RC$ ), Sin embargo, el número de centros de reacción activos disminuye, por lo cual se provoca una disminución en el rendimiento cuántico para el transporte de electrones ( $\phi E_0$ ).

Estos cambios resultan en un aumento en el flujo de energía disipada por cada centro de reacción ( $DI_0/RC$ ), una disminución en la máxima eficiencia cuántica para la fotoquímica primaria ( $\phi P_0$ ), en el índice de rendimiento en base a la absorción ( $PI_{ABS}$ ), lo cual definitivamente conlleva a una reducción de la



fotosíntesis global total, cuyas afectaciones finalmente resultan en el deterioro de toda la fotosíntesis total ( $PI_{TOTAL}$ ).

Estas respuestas fisiológicas indican que bajas concentraciones de la claritromicina puede provocar efectos nocivos, lo cual podría plantear grandes riesgos potenciales de impacto sobre las poblaciones de microalgas en el ambiente, con la consecuencia de reducir los servicios ambientales, modificar la dinámica de los ambientes y finalmente alterar el equilibrio ecológico principalmente en ecosistemas acuáticos. Tales efectos negativos sobre los organismos fotosintéticos, son la razón por lo cual existe la urgente necesidad de regular la forma indiscriminada en que los productos farmacéuticos son descargados a los cuerpos de agua, así como elaborar planes de manejo integral para la correcta eliminación de los mismos.

## IX. Bibliografía

Andreozzi, R., Marotta, R., Paxe'us, N. 2003. Pharmaceuticals in STP effluents and their solar photodegradation in aquatic environment. *Chemosphere*; 50: 1319-1330.

Aksmann, A., Tukaj, Z. 2008. Intact anthracene inhibits photosynthesis in algal cells: A fluorescence induction study on *Chlamydomonas reinhardtii* cw92 strain. *Chemosphere*, 74: 26–32.

Appenroth K.J., Stöckel J., Srivastava A., Strasser R.J. 2001. Multiple effects of chromate on the photosynthetic apparatus of *Spirodela polyrhiza* as probed by OJIP chlorophylla fluorescence measurements. *Environmental Pollution*.115: 49-64.

Belyaeva, N.E., Schmitt, F.J., Paschenko, V.Z., Riznichenko, G.Yu. Rubin, A.B., Renger, G. 2011. PSII model based analysis of transient fluorescence yield measured on whole leaves of *Arabidopsis thaliana* after excitation with light flashes of different energies. *Elsevier. BioSystems*. 103:188-195.

Balsera, D.M., 2004. Análisis estructural de la proteína extrínseca PsbQ del fotosistema II de plantas superiores. Departamento de Bioquímica y Biología Molecular. Universidad de Salamanca. Tesis Doctoral. 9-207

Barceló, L.D., López de Alda, M.J., 2008. Contaminación y calidad del agua: el problema de los contaminantes emergentes. Instituto de Investigaciones Químicas y Ambientales-CSIC. Barcelona. 1-24pp.

Barcelo, D., Petrovic, M., Radjenovic, J. 2009. Treating emerging contaminants (pharmaceuticals) in wastewater and drinking water treatment plants. Department of Environmental Chemistry, Barcelona, España. 88: 133-140.

Benbroock, C.M., 2002. Antibiotic drug use in U.S. aquaculture: information available on the World Wide Web. <http://www.latp.org>.2002.

Bishop D.G., Smillie R.M., 1970. The effect of chloramphenicol and cycloheximide on lipid synthesis during chloroplast development in *Euglena gracilis*. *Archives of Biochemistry and Biophysics*. 137: 179-189.

Blache, U., Jakob, T. Su, W., Wilhem, C. 2011. The impact of cell-specific absorption properties on the correlation of electron transport rates measured by chlorophyll fluorescence and photosynthetic oxygen production in planktonic algae. *Plant Physiology and Biochemistry*. Elsevier. 49: 801-808.

Bottoni, P., Caroli, S., Barra, C.A., 2010. Pharmaceuticals as priority water contaminants. *Toxicological and Environmental Chemistry*. Vol. 92 (3): 549-565.

Borowitzka, M.A., Borowitzka L.J. 1988. Microalgal biotechnology. Cambridge University Press. New York. 1-477.

Brausch, J.M., Rand, G.M., 2010. A review of personal care products in the aquatic environment: Environmental concentration and toxicity. Elsevier. Chemosphere. 82 (11) 1518-1532.

Briantais, J.M., Vernotte, C., Krause, G.H., Weis, E. 1988. The modification of chlorophyll fluorescence of *Chlamydomonas reinhardtii* by photoinhibition and chloramphenicol addition suggest a form of photosystem II less susceptible to degradation. Elsevier. Federation of European Biochemical Societies. 236 (1): 226-231.

Calamari, D., Zuccato, E., Castiglioni, S., Bagnati, R., Fanelli, R. 2003. Strategic survey of therapeutic drugs in the rivers Po and Lambro in Northern Italy. Environmental Science Technology; 37:1241-1248.

Campa, C.A.I., Luna, G.A., Ascencio, F., Cortés, J.E., Cáceres, M.C.J. 2006. Effects of chloramphenicol, erythromycin, and furazolidone on growth of *Isochrysis galbana* and *Chaetoceros gracilis*. Elsevier. ScienceDirect. Aquaculture. 260 : 145-150.

Carbonera, D., Gerotto, C., Posocco, B., Giacometti, G.M., Morosinotto, T. 2012. NPQ activation reduces chlorophyll triplet state formation in the moss *Physcomitrella patens*. Biochimica et Biophysica Acta.

Castiglioni, S., Fanelli, R., Calamari, D., Bagnati, R., Zuccato, E. 2004. Methodological approaches for studying pharmaceuticals in the environment by comparing predicted and measured concentrations in River Po, Italy. Regulatory Toxicological Pharmacology; 39:25-32.

Castiglioni, S., Bagnati, R., Fanelli, R., Pomati, F., Calamari, D., Zuccato, E. 2006. Removal of pharmaceuticals in sewage treatment plants in Italy. Environmental Science Technology 40:357-363.

Chen, K., Hu, G., Keutgen, K. 1999. Effects of NaCl and CO<sub>2</sub> enrichment on pepino (*Solanum muricatum* Ait) II. Leaf photosynthetic properties and gas exchange. Science. Horticulture. 81:43-56.

Chen, L. S., y Cheng, L. 2010. The acceptor side of photosystem II is damaged more severely than the donor side of photosystem II in 'Honeycrisp' apple leaves with zonal chlorosis. Acta Physiology Plant, 32:253–26.

Christen, V., Hickmann, S., Rechenberg, B., Fent, K. 2010. Highly active human pharmaceuticals in aquatic systems: A concept for their identification based on their mode of action. Aquatic toxicology. 96:167-181.

Clara, M., Kreuzinger, N., Strenn, B., Gans, O., Kroiss, H. 2005. The solid retention time-a suitable design parameter to evaluate the capacity of wastewater treatment plants to remove micropollutants. *Water Reserch* 39:97-106.

Colón, O.A.J., 2010. Determinación de la presencia de naproxeno, fluoxentina, atorvastatina, enalapril y acetaminofeno en el lago Guayo y el lago Lucchetti en el sur de Puerto Rico. Universidad Interamericana de Puerto Rico. *Revista* 360. (5) 1-10.

Comisión Nacional del Agua (CONAGUA). 2011. Estadísticas del Agua en México, edición 2010. Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales. México. <http://www.conagua.gob.mx/OCB07/Contenido/Documentos/EstadisticaAguamexico2011.pdf>

Corcoran, J., Winter, M.J., Tyler, C.R. 2010. Pharmaceutical in the aquatic environment: A critical review of the evidence for health effects in fish. *Critical Reviews in Toxicology* 40(4): 287-304.

Daughton, C.G., Ternes, T.A., 1999. Pharmaceuticals and care products in the environment: agents of subtle change?. *Enviromental Health Perspectivs*. 107 (6): 907-942.

Eguchi, K., Nagase, H., Ozawa, M., Endoh, Y.S., Goto, K., Hirata, K., Miramoto, K., Yoshimura, H. 2004. Evaluation of antimicrobial agents for veterinary use in the ecotoxicity test using microalgae. *Chemosphere*. Elsevier. 57: 1733-1738.

European Commission. Regulation (EC) No. 1907/2006 of the European Parliament and of the Council of 18 December 2006 concerning the Registration, Evaluation, Authorisation and Restriction of Chemicals (REACH), establishing a European Chemicals Agency, amending Directive 1999/45/EC and repealing Council Regulation (EEC) No. 793/93 and Commission Regulation (EC) No. 1488/94 as well as Council Directive 76/769/EEC and Commission Directives 91/155/EEC, 93/67/EEC, 93/105/EC and 2000/21/EC. Office for Official Publications of the European Communities (OPOCE). Off J Eur Union 2006, L 396/1 of 30.12.2006. <http://publications.europa.eu>

European Medicines Agency (EMA). 2005. Draft Guideline on the Environmental Risk Assessment of Medicinal Products for Human Use CHMP/SWP/4447/00. The European Agency for the Evaluation of Medicinal Products.

European Medicines Agency (EMA). 2008. Veterinary Medicines and Inspections. Committee for medicinal products for veterinary use (CVMP). Revised guideline on environmental impact assessment for veterinary medicinal products in support of the vich guidelines gl 6 and gl 38.

Estevéz, M.C., Front, H., Nichkova, M., Salvador, J.P., Varela, B., Baeza, S.F., Marco, M.P. 2005. Immunochemical Determination of Pharmaceuticals and Personal Care Products as Emerging Pollutants. *The Handbook of Environmental Chemistry Vol. 5, Part 0*: 181-244

FEDESA, 2003. Annual Veterinary Antibiotic Use in the EU in 1999.

Fent, K., Weston, A.A., Caminada, D. 2006. Ecotoxicology of human pharmaceuticals. *Aquatic toxicology* 76:122-159.

Freyssinet, G., Eichholz, R.L., Buetow, D.E. 1984. Kinetics of accumulation of Ribulose-1, 5-bisphosphate Carboxylase during greening in *Euglena gracilis*. *Plant Physiology*, 75: 850-857.

Giger, W., Alder, A.C., Golet, E.M., Kohler, H.P.E., McArdell, C.S., Molnar, E., Siegrist, H. Suter, M.J.F., 2003. Occurrence and fate of antibiotics as trace contaminants in wastewaters, sewage sludges, and surface waters. *Chimia. Environmental Analysis*. 57:485-491.

Gómez, J.E.A. 2012. Caracterización de la actividad fotosintética de *Chlorella vulgaris* creciendo en presencia de estreptomycin. Tesis de Licenciatura. UNAM-FESI. 1-102.

Gonzales, M.S., Perales, V.H.V., Salcedo, A.M.O. 2008. La Fluorescencia de la Clorofila a Como Herramienta en la Investigación de Efectos Tóxicos en el Aparato Fotosintético de Plantas y Algas. *Revista de Educación Bioquímica*. 27 (4): 119-129.

Gros, M., Petrovic, M., Barceló, D. 2007. Wastewater treatment plants as a pathway for aquatic contamination by pharmaceuticals in the Ebro river basin (Northwest Spain). *Environmental Toxicology. Chemistry*. 26(8):1553-1562.

Halling-Sørensen, B., Nors, S., Lanzky, P.F., Ingerslev, F., Holten Lu" tzhøft, H.C., Jørgensen, S.E. 1998. Occurrence, fate and effects of pharmaceutical substances in the environment a review. *Chemosphere*. 36 (2): 357–393.

Halling-Sørensen, B. 2000. Algal toxicity of antibacterial agents used in intensive farming. *Chemosphere. Ergamon*. 40: 731-739.

Hereber, T. 2002. Occurrence, fate, and removal of pharmaceutical residues in the aquatic environment: a review of recent research data. *Toxicology Letters. Germany*. 131:5-17.

Hernando, M. D., Mezcuca, M., Fernández-Alba, A. R., Barceló, D. 2006. Environmental risk assessment of pharmaceutical residues in wastewater effluents, surface waters and sediments. *Elsevier. Talanta*, 69, 334-342.

Hijosa-Valsero, M., Matamoros, V., Martin-Villacorta, J., Bécares, E., Bayona, J.M. 2010. Assessment of full-scale natural systems for the removal of PPCPs from wastewater in small communities. Elsevier. Water research. España. 44: 1429-1439.

Hirsch, R., Ternes, T., Haberer, K., Kratz, K.-L. 1999. Occurrence of antibiotics in the aquatic environment. Science Total Environmental. 225: 109-118.

Holten Lützhøft, H.C., Halling-Sørensen, B., Jørgensen, S.E. 1999. Algal toxicity of antibacterial agents applied in Danish fish farming. Archives Environmental Contamination and Toxicology, 36: 1-6.

Isidori, M., Lavorgna, M., Nardelli, A., Pascarella, L., Parrella, A. 2005. Toxic and genotoxic evaluation of six antibiotics on non-target organisms. Science of the Total Environment. Elsevier. 346: 97-98.

Jiang, C.D., Gao, H.Y., Zou, Q. 2003. Effects of streptomycin treated on chlorophyll fluorescence parameters and xanthophyll de-epoxidation level in maize leaves. Journal of plant physiology and molecular biology. Journal of Plant Physiology and Molecular Biology. 29: 221-226.

Jiang, H.X., Chen, L.S., Zheng, J.G., Han, S., Tang, N., Smith, B.R. 2008. Aluminum induced effects on Photosystem II photochemistry in Citrus leaves assessed by the chlorophyll a fluorescence transient. Tree Physiology 28:1863-1871.

Jjemba, P.K. 2002. The potential impact of veterinary and human therapeutic agents in manure and biosolids on plants grown on arable land: a review. Agriculture Ecosystem Environmental. 93: 267-278.

Jjemba, P.K. 2006. Excretion and ecotoxicity of pharmaceuticals and care products in the environment. Elsevier. Ecotoxicology and Environmental Safety.. 63: 133-130.

Joss, A., Zabczynski, S., Göbel, A., Hoffmann, B., Löffler, D., McArdell, C.S., Ternes, T.A., Thomsen, A., Siegrist, H. 2006. Biological degradation of pharmaceuticals in municipal wastewater treatment: Proposing a classification scheme. Elsevier. Water Research. 40: 1686-1696

Kanfer, I., Skinner, M.F., Walker, R.B. 1998. Analysis of macrolide antibiotics. Elsevier. Journal of Chromatography. 812: 255-286.

Kar, S., Roy, K., 2010. First report on interspecies quantitative correlation of ecotoxicity of pharmaceuticals. Elsevier. Chemosphere. 81: 738-747.

Knacker, T., Duis, K., Ternes, T., Fenner, K., Escher, B., Schmitt, H., Römbke, J., Garric, J., Hutchinson, T., Boxall, A.B.A. 2005. The EU project ERA

Pharmaceuticals Incentives for the further development of guidance documents? Environmental Science Pollutante Res. 12, 62–65.

Kolpin, D.W., Furlong, E.T., Meyer, M.T., Thurman, E.M., Zaugg, S.D., Barber, L.B., Buxton, H.T. 2002. Pharmaceuticals, Hormones and other Organic Wastewater Contaminants in U.S. Streams, 1999-2000: A National Reconnaissance. Environmental Science and Technology. 36 (6): 1202-1211.

Koussevitzky, S., Nott, A., Mockler, T.C., Hong, F., Sachetto-Martins, G., Surpin, M. 2007. Signals from chloroplasts converge to regulate nuclear gene expression. Science, 316: 715-719.

Küpper, H., Setlik, I., Spiller, M., Küpper, F.C. Prásil, O. 2002 Heavy metal-induced inhibition of photosynthesis: Targets of in vivo heavy metal chlorophyll formation. Journal of Phycology. 38:429-441.

Kümmerer, K. 2009. Lai, H.T., Hou J.H., Su,C.I., Chen C.L. 2009. Effects of chloramphenicol, florfenicol, and thiamphenicol on growth of algae *Chlorella pyrenoidosa*, *Isochrysis galbana*, and *Tetraselmis chui*. Ecotoxicology Environmental Safe. 72:329–334.

Lai, H.T., Hou, J.H., Su, C.I., Chen, C.L. 2009. Effects of chloramphenicol, florfenicol and thiamphenicol on grown of algae *Chlorella pyrenoidosa*, *Isochrysis galbana*, and *Tetraselmis chui*. Elsevier.Ecotoxicology and Environmental Safety. 72: 329-334.

la Farré, M., Pérez, S., Kantiani, L., Barceló, D., 2008. Fate and toxicity of emerging pollutants, their metabolites and transformation products in the aquatic environment. Trends in Analytical Chemistry. 27 (11): 991-1007.

Lange, F., Cornelissen, S., Kubac, D., Sein, M.M., Von Sonntag, J., Hannich, C.B., Golloch, A. 2006. Degradation of macrolide antibiotics by ozone: A mechanistic case study with clarithromycin. Elsevier. Chemosphere. 65: 17-23.

Li, Z.H., Randak, T. 2009. Residual pharmaceutically active compounds (PhACs) in aquatic environment-status, toxicity and kinetics: a review. Veterinary Medicine. 52 (7): 295-314.

Li, Z.J., Xie, X.Y., Zhang S.Q., Liang, Y.C. 2011. Wheat growth and photosynthesis as affected by Oxytetracycline as a soil contaminant. Elsevier. Pedosphere. 21 (2): 244-250.

Liu, B.Y., Nie, X.P., Liu, W.Q., Snoeijs, P., Guan Chao, T.M.T.K. 2011. Toxic effects of erythromycin, ciprofloxacin and sulfamethoxazole on photosynthetic apparatus in *Selenastrum capricornatum*. Elsevier. Ecotoxicology and Environmental Safety. 74: 1027-1035<sup>a</sup>.

Liu, B.Y., Liu, W., Nie, X., Guan, C., Yang, Y., Wang, Z., Liao, W. 2011. Growth response and toxic effects of three antibiotics on *Seneciojacobaea capricornutum* evaluated by photosynthetic rate and chlorophyll biosynthesis. *Journal of Environmental Sciences*. 23 (9): 1558-1563<sup>b</sup>.

Lu, C., Qiu, N., Lu, Q., Wang, B., Kuang, T. 2003. PSII photochemistry, thermal energy dissipation, and the xanthophyll cycle in *Kalanchoë daigremontiana* exposed to a combination of water stress and high light. *Physiol plantarum*, 118: 173-182.

McArdell, C.S., Molnar, E., Suter, M.J.F., Giger, W. 2003. Occurrence and fate of macrolide antibiotics in wastewater treatment plants and in the Glatt valley watershed, Switzerland. *Environmental Science Technology*. 24:5479-5486.

Mathur, S., Allakhverdiev, S.I., Jajoo, A. 2011. Analysis of high temperature stress on the dynamics of antenna size and reducing side heterogeneity of Photosystem II in wheat leaves (*Triticum aestivum*). Elsevier. *Biocimica et Biophysica Acta*. 1807: 22-29.

Maxwell, K., Johnson, G.N. 2000. Chlorophyll fluorescence: a practical guide. *Journal Experimental Botany*. 51(345): 659-668.

Metcalf, C.D., Koenig, B.G., Bennie, D.T., Servos, M., Ternes, T.A., Hirsch, R. 2003. Occurrence of acidic and neutral drugs in the effluents of Canadian sewage treatment plants. *Environmental Toxicology Chemical*. 22: 2872-2880.

Mompelat, S., Le, B., Thomas, O. 2009. Occurrence and fate of pharmaceutical products and by-products, from resource to drinking water. *Environmental International*. 35: 803-814.

Montoya, B.G. 1993. Caracterización del centro de reacción del fotosistema II. Estudio de una proteína de membrana. Tesis Doctoral. Consejo Superior de Investigaciones Científicas (C.S.I.C.). 1-238.

NOM-001-ECOL-1996. Norma Oficial Mexicana que establece los límites máximos permisibles de contaminantes en las descargas de aguas residuales en aguas y bienes nacionales. Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales. México, Diario Oficial/23-04-2003.

Nie, X.P., Liu, B.Y., Yu H.J., Liu, W.Q., Yang, Y.F., Toxic effects of erythromycin, ciprofloxacin and sulfamthoxazole exposure to the antioxidant system in *Pseudokirchneriella subcapitata*. Elsevier. *Environmental Pollution*. 172: 23/32.

Nunes, B., Carvalho, F., Guilhermino, L. 2005. Acute toxicity of widely used pharmaceuticals in aquatic species: *Gambusi holbrooki*, *Artemia parthenogenetica* and *Tetraselmis chuii*. Elsevier. *Ecotoxicology and Environmental Safety*. 61: 413-419.



Ocampo A.H., Garcia M.E., Govindjee. 2013. Antagonist effect between violaxanthin and de-epoxidated pigments in nonphotochemical quenching induction in the qE deficient brown alga *Macrocystis pyrifera*. Elsevier. *Biochimica et Biophysica Acta*. 1827: 427-437.

Okada, K., Satoh, K., Katoh, S. 1991. Chloramphenicol is an inhibitor of photosynthesis. *FEBS*. 295 (1,2,3) 155-158.

Organization for Economic Cooperation and Development (OECD/OCDE). 2006. Guidelines for the testing of chemicals. Freshwater Alga and Cyanobacteria, Growth Inhibition Test. Protocol 201.

Paciel, D., Savio, L.E. 2010. Antibiótico terapia. Macrólidos y claritromicina. Cátedra de Enfermedades Infecciosas. Gramon Bagó. 5-8.

Pan, X., Zhang, D., Chen, X., Mu, G., Li, L., Bao, A. 2009. Effects of levofloxacin hydrochloride on photosystem II activity and heterogeneity of *Synechocystis sp.* Elsevier. *Chemosphere*. 77: 413-418.

Perron, M.C., Qiu, B., Boucher, N., Bellemare, F., Juneau, P. 2012. Use of chlorophyll a fluorescence to detect the effect of microcystins on photosynthesis and photosystem II energy fluxes of green algae. Elsevier. *Toxicol*. 59: 567-577

Pomati, F., Netting, A.G., et al., 2004. Effects of erythromycin, tetracycline and ibuprofen on the growth of *Synechocystis sp.* and *Lemna minor*. *Aquatic Toxicology*. 67 (4), 387–396.

Qian, F., Li, J., Pan, X., Sun, Z., Ye, C., Jin, G., Fu, Z. 2010. Effects of Streptomycin on Growth of Algae *Chlorella vulgaris* and *Microcystis aeruginosa*. *Environ Toxicol*, 27 (4): 229-237.

Richardson, B.J., Lam, P.K.S., Martin, M. 2005. Emerging chemicals of concern: Pharmaceuticals and personal care products (PPCPs) in Asia, with Particular reference to southern China. Elsevier. *Marine Pollution Bulletin*. 50: 913-920.

Richardson, S.D., 2007. Water analysis: emerging contaminants and current issues. *Analytical Chemistry*. 79 (12): 4295- 4323.

Rodríguez, F.A.A., Letón, G.P., Rosal, G.R., Dorado, V.M., Villar, F.S., Sanz, G.J.M. 2006. Tratamientos avanzados de aguas residuales industriales. *Circulo de Innovación en Tecnologías Medio ambientales y energía*. 11-136.

Salazar, G.M. 2009. Sistemas integrales de tratamiento de aguas residuales, mediante uso combinado de digestión anaerobia y microalgas. Departamento de Biotecnología. UAM-Iztapalapa. México. 73: 16-22.

Sanderson, H., Johnson, D.J., Wilson, C.J., Brain, R.A., Solomon, K.R., 2003. Probabilistic hazard assessment of environmentally occurring pharmaceuticals toxicity to fish, daphnids and algae by ECOSAR screening. *Toxicology Letters* 144, 383–395.

Santos, L.H.M.L.M., Araujo, A.N., Fabrichi, A., Pena, A., Delerue-Matos, C. Montenegro, M.C.B.S.M. 2010. Ecotoxicological effects related to the presence of pharmaceuticals in the aquatic environment. Elsevier. *Journal of Hazardous Materials*. 175:45-95.

Shala, L., Foster, G.D. 2010. Surface Water Concentrations and Loading Budgets of Pharmaceuticals and Other Domestic-Use Chemicals in an Urban Watershed (Washington, DC, USA). *Archive Environmental Contamination and Toxicology*, 58:551–561.

Stirbert, A., Govindjee. 2011. On the relation between the Kautsky effect (chlorophyll a fluorescence induction) and Photosystem II: Basics and applications of the OJIP fluorescence transient. Elsevier. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*. 104: 236-257.

Strasser, B.J., Strasser, R.J., 1995. Measuring fast fluorescence transients to address environmental questions: the JIP test. In: Mathis, P. (Ed.). In: *Photosynthesis: from Light to Biosphere* vol. V. Kluwer Academic Publisher, The Netherlands. 977–980.

Strasser R.J., Srivastava A., Govindjee 1995. Polyphasic chlorophyll a fluorescence transient in plant and cyanobacteria. *Photochemistry and Photobiology*. 61: 32–42.

Strasser, B.J. 1997. Donor side capacity of Photosystem II probed by chlorophyll a fluorescence transients. *Photosynthesis Research*. 52: 147-155.

Strasser B.J., Dau H., Heinze I., Senger H., 1997. Comparison of light induced and cell cycle dependent changes in the photosynthetic apparatus: a fluorescence induction study on the green alga *Scenedesmus obliquus*. *Photosynthesis Reserch*. 60: 217–227.

Strasser, R.J., Srivastava, A., Tsimilli-Michael, M. 2004. Analysis of the chlorophyll a fluorescence transient. In: Papageorgiou GC, Govindjee (eds) *Chlorophyll a Fluorescence: A Signature of Photosynthesis*, *Advances in Photosynthesis and Respiration*. Springer, Dordrecht. 19: 321-362.

Supratik, K., Kunal, R., 2013. First report on predictive chemometric modeling, 3d-toxicophore mapping and *in silico* screening of *in vitro* basal cytotoxicity of diverse organic chemical. Elsevier. *Toxicology in vitro*. 27:597-608.

Takahashi, S., Milward, S.E., Fa, D.Y., Chow, W.S., Badger, M.R. 2009. How Does Cyclic Electron Flow Alleviate Photoinhibition in *Arabidopsis*? *Plant Physiology*. 149: 1560-1567.

Ternes, T.A. 1998. Occurrence of drugs in German sewage treatment plants and rivers. *Water Reserch. Great Britain*. 32: 3245-3260.

Ternes, T.A., Joss, A. 2006. Human Pharmaceuticals, Hormones and Fragrances. The challenge of micropollutants in urban water management edited by Ternes and Joss. Alder, A.C., Bruchet, A., Carballa, M., Joss, A., Löffler, D., McArdell, C.S., Miksch, K., Omil, F., Tuhkanen, T., Ternes, T.A. 2006. Capter 2. Consumption and Occurrence. London, UK. 16-54.

Thuenhan, D.I. 1990. Antioxidant vitamins and cancer prevention. *Journal of Micronutrient Analysis*. 7: 279–299.

Tóth, S.Z., Schansker, G., Strasser, R.J. 2002. In intact leaves, the maximum fluoresncence level (FM) is independent the redox state of the platoquinone pool: A DCMU- inhibitory study. Elsevier. *Biochimica et Biophysica Acta*. 1708: 272-285.

Tóth, S.Z. 2006. Analysis and Aplication of the Fast Chl a Fluorescence (OJIP) Transient Complementd with Simultaneous 820 nm Transmission Measurements. Tesis de Doctorado. Laboratoire de bioénergétique et microbiologie. GENÈVE. 1-153.

Tóth, S.Z., Schansker, G., Garab, G., Strasser, R.J. 2007. Photosynthetic electron transport activity in heat-treated barley leaves: The role of internal alternative electron donors to photosystem II. Elsevier. *Bioquimica et Biophysica Acta*. 1767: 295-305.

Tomisek, A., Reid, M.R., Short, W.A., Skipper, H.E. 1957. Studies on the photosynthetic reaction. III. The effects of various inhibitors upon growth and carbonate-fixation in *Chlorella pyrenoidosa*. *Plant Physiology*. 32(1):7-10.

Valdés, A.A. 2009. Evaluación de la toxicidad producida por diclofenaco sobre *Daphnia magna*. Químico Fármaco Biólogo. Instituto Politécnico Nacional. 1-34pp.

Van der Grinten., Pikkemaat M.G., Van den Brandhof, E.J., Stroomberg, G.J., Kraak, M.H.S. 2010. Comparing the sensitivity of algal, cyanobacterial and bacterial bioassays to different groups of antibiotics. *Chemosphere*. 80 1-6.

Van Heerden, P.D.R., Strasser, R.J., Krüger, G.H.J. 2004. Reduction of dark chilling stress in N<sub>2</sub>-fixing soybean by nitrate as indicate by chlorophyll a fluorescence kinetics. *Physiology Plantarum*. 12, 239-249.

Verlicchi, P., Galletti, A., Petrovic, M., Barceló D. 2010. Hospital effluents as a source of emerging pollutants: An overview of micropollutants and sustainable treatment options. Elsevier. *Journal of Hydrology*. 389: 416-428.

W. Linnane A., R. Sterwart P. 1967. The inhibition of chlorophyll formation in *Euglena* by antibiotics wich inhibit bacterial and mitochondrial protein synthesis. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 27: (5) 511-516.

Wellburn, A.R. 1994. The spectral determination of chlorophylls a and b as well as total carotenoids, using various solvents with spectrophotometers of different resolution. *Journal Plant Physiology*. 144, 307-313.

Wishart Davis, 2012. Disponible en: [www.drugbank.ca/drugs/DB01211](http://www.drugbank.ca/drugs/DB01211) DATA BANK GRUGS

Wu, C., Spongberd, A.L., Witter, J.D., Fang, M., Ames, A., Czajkowski, K.P. 2010. Detection of Pharmaceuticals and Personal Care Products in Agricultural Soils Receiving Biosolids Application. *Detection and Pharmaceuticals and Personal Care Products in Agricultural Soils*. 38 (3): 230-237

Yang, W., Tang, Z., Zhou, F., Zhang, W., Song, L. 2013. Toxicity studies of tetracycline on *Microcystis aeruginosa* and *Selenastrum capricornutum*. Elsevier. *Environmental Toxicology and Pharmacology*. 35: 320-324.

Yusuf, M.A., Kumar, D., Rajwanshi, R., Strasser, R.J., Tsimilli-Michael, M. Govindjee., Sarin, N.B. 2010. Overexpression of  $\gamma$ -tocopherol methyl transferase gene in transgenic *Brassica juncea* plants alleviates abiotics stress: Physiological and chlorophyll a fluorescence measurements. Elsevier. *Biochimica et Biophysica Acta*. 1797:1428-1438.

Zheng, Q., Zhang, R., Wang, Y., Pan, X., Tang, J., Zhang, G. 2012. Occurrence and distribution of antibiotics in the Beibu Gulf, Chin: Impacts of river discharge and aquaculture activities. Elsevier. *Marine Enviromental Research*. 78: 26-33.

Zhu, H., X. Chen, X. Pan and D. Zhang, 2011. Effects of chloramphenicol on pigmentation, proline accumulation and chlorophyll fluorecence of maize (*Zea mays*) seedlings. *International Journal of Agricultural and Biology*, 13: 677–682.

## X. Apéndice

**Análisis de varianza de un factor y Tukey (p=0.05) (Datos analizados previamente con prueba de distribución normal y homogeneidad de varianzas de Bartlett)**

**Figura 3. Peso seco**

Sistema SAS  
Procedimiento ANOVA

Variable dependiente: **Peso Seco**

Fuente	DF	Suma de cuadrados	Cuadrado de la media	F-Valor	Pr > F
Modelo	5	9792.454649	1958.490930	736.67	<.0001
Error	12	31.902973	2.658581		
Total correcto	17	9824.357622			

R-cuadrado	Coef Var	Raiz MSE	y Media
0.996753	1.940660	1.630516	84.01862

Fuente	DF	Anova SS	Cuadrado de la media	F-Valor	Pr > F
Tratamiento	5	9792.454649	1958.490930	736.67	<.0001

Prueba del rango estudentizado de Tukey (HSD) para Peso Seco

Alfa	0.05
Error de grados de libertad	12
Error de cuadrado medio	2.658581
Valor crítico del rango estudentizado	4.75015
Diferencia significativa mínima	4.4717

Medias con la misma letra no son significativamente diferentes.

Tukey Agrupamiento	Media	N	cla
A	121.365	3	1
B	103.118	3	2
C	87.498	3	3
D	75.056	3	4
E	66.071	3	5
F	51.003	3	6

## Figura 4. Velocidad de crecimiento ( $\mu$ )

Sistema SAS  
Procedimiento ANOVA

Variable dependiente: **velocidad de crecimiento**

Fuente	DF	Suma de cuadrados	Cuadrado de la media	F-Valor	Pr > F
Modelo	5	1.88897659	0.37779532	736.67	<.0001
Error	12	0.00615412	0.00051284		
Total correcto	17	1.89513071			

R-cuadrado	Coef Var	Raiz MSE	y Media
0.996753	2.164905	0.022646	1.046053

Fuente	DF	Anova SS	Cuadrado de la media	F-Valor	Pr > F
cla	5	1.88897659	0.37779532	736.67	<.0001

Prueba del rango estudentizado de Tukey (HSD) para velocidad de crecimiento

NOTA: Este test controla el índice de error experimentwise de tipo I, pero normalmente tiene un índice de error de tipo II más elevado que REGWQ.

Alfa	0.05
Error de grados de libertad	12
Error de cuadrado medio	0.000513
Valor crítico del rango estudentizado	4.75015
Diferencia significativa mínima	0.0621

Medias con la misma letra no son significativamente diferentes.

Tukey Agrupamiento	Media	N	Tratamiento
A	1.56476	3	1
B	1.31133	3	2
C	1.09437	3	3
D	0.92158	3	4
E	0.79678	3	5
F	0.58750	3	6

## Figura 5. Tiempo de duplicación (td)

Sistema SAS  
Procedimiento ANOVA

Variable dependiente: **Tiempo de duplicación celular**

Fuente	DF	Suma de cuadrados	Cuadrado de la media	F-Valor	Pr > F
Modelo	5	1.06972380	0.21394476	238.80	<.0001
Error	12	0.01075106	0.00089592		
Total correcto	17	1.08047487			

R-cuadrado	Coef Var	Raiz MSE	y Media
0.990050	4.072097	0.029932	0.735050

Fuente	DF	Anova SS	Cuadrado de la media	F-Valor	Pr > F
cla	5	1.06972380	0.21394476	238.80	<.0001

Prueba del rango estudentizado de Tukey (HSD) para y

NOTA: Este test controla el índice de error experimentwise de tipo I, pero normalmente tiene un índice de error de tipo II más elevado que REGWQ.

Alfa	0.05
Error de grados de libertad	12
Error de cuadrado medio	0.000896
Valor crítico del rango estudentizado	4.75015
Diferencia significativa mínima	0.0821

Medias con la misma letra no son significativamente diferentes.

Tukey Agrupamiento	Media	N	cla
A	1.18170	3	6
B	0.87123	3	5
C	0.75233	3	4
D	0.63340	3	3
E	0.52863	3	2
F	0.44300	3	1

## Figura 6. Porcentaje de inhibición CE50

Sistema SAS  
Procedimiento ANOVA

Variable dependiente: CE50

Fuente	DF	Suma de cuadrados	Cuadrado de la media	F-Valor	Pr > F
Modelo	5	6648.147679	1329.629536	736.68	<.0001
Error	12	21.658854	1.804904		
Total correcto	17	6669.806533			

R-cuadrado	Coef Var	Raiz MSE	y Media
0.996753	1.940649	1.343467	69.22775

Fuente	DF	Anova SS	Cuadrado de la media	F-Valor	Pr > F
cla	5	6648.147679	1329.629536	736.68	<.0001

Prueba del rango estudentizado de Tukey (HSD) para y

NOTA: Este test controla el índice de error experimentwise de tipo I, pero normalmente tiene un índice de error de tipo II más elevado que REGWQ.

Alfa	0.05
Error de grados de libertad	12
Error de cuadrado medio	1.804904
Valor crítico del rango estudentizado	4.75015
Diferencia significativa mínima	3.6845

Medias con la misma letra no son significativamente diferentes.

Tukey Agrupamiento	Media	N	cla
A	100.000	3	1
B	84.965	3	2
C	72.094	3	3
D	61.843	3	4
E	54.440	3	5
F	42.024	3	6



## Figura 7. Pigmentos fotosintéticos

Sistema SAS  
Procedimiento ANOVA

Variable dependiente: **clorofila total**

Fuente	DF	Suma de cuadrados	Cuadrado de la media	F-Valor	Pr > F
Modelo	5	4.91466294	0.98293259	125.18	<.0001
Error	12	0.09422954	0.00785246		
Total correcto	17	5.00889249			

R-cuadrado	Coef Var	Raiz MSE	y Media
0.981188	3.151319	0.088614	2.811969

Fuente	DF	Anova SS	Cuadrado de la media	F-Valor	Pr > F
cla	5	4.91466294	0.98293259	125.18	<.0001

Prueba del rango estudentizado de Tukey (HSD) para y

NOTA: Este test controla el índice de error experimentwise de tipo I, pero normalmente tiene un índice de error de tipo II más elevado que REGWQ.

Alfa	0.05
Error de grados de libertad	12
Error de cuadrado medio	0.007852
Valor crítico del rango estudentizado	4.75015
Diferencia significativa mínima	0.243

Medias con la misma letra no son significativamente diferentes.

Tukey Agrupamiento	Media	N	cla
A	3.73846	3	1
B	2.95671	3	2
B			
C B	2.90108	3	3
C			
C D	2.70607	3	4
D			
D	2.58789	3	5
E	1.98160	3	6

Variable dependiente: **Carotenoides totales**

Fuente	DF	Suma de cuadrados	Cuadrado de la media	F-Valor	Pr > F
Modelo	5	0.07149027	0.01429805	35.54	<.0001
Error	12	0.00482819	0.00040235		
Total correcto	17	0.07631846			

R-cuadrado	Coef Var	Raiz MSE	y Media
0.936736	3.544035	0.020059	0.565983

Fuente	DF	Anova SS	Cuadrado de la media	F-Valor	Pr > F
cla	5	0.07149027	0.01429805	35.54	<.0001

Prueba del rango estudentizado de Tukey (HSD) para y

NOTA: Este test controla el índice de error experimentwise de tipo I, pero normalmente tiene un índice de error de tipo II más elevado que REGWQ.

Alfa	0.05
Error de grados de libertad	12
Error de cuadrado medio	0.000402
Valor crítico del rango estudentizado	4.75015
Diferencia significativa mínima	0.055

Medias con la misma letra no son significativamente diferentes.

Tukey Agrupamiento	Media	N	cla
A	0.64303	3	1
A			
B A	0.60980	3	3
B			
B	0.57137	3	4
B			
B	0.56763	3	2
B			
B	0.56433	3	5
C	0.43973	3	6

## Figura 8. $\mu\text{moles O}_2 \text{ mg}^{-1} \cdot \text{Chl} \cdot \text{h}^{-1}$

### Fotosíntesis

Sistema SAS  
Procedimiento ANOVA

Variable dependiente: **Fotosíntesis**

Fuente	DF	Suma de cuadrados	Cuadrado de la media	F-Valor	Pr > F
Modelo	5	1.2130955E12	242619104961	210.22	<.0001
Error	12	13849430213	1154119184.4		
Total correcto	17	1.226945E12			

R-cuadrado	Coef Var	Raiz MSE	y Media
0.988712	5.355648	33972.33	634327.2

Fuente	DF	Anova SS	Cuadrado de la media	F-Valor	Pr > F
cla	5	1.2130955E12	242619104961	210.22	<.0001

Prueba del rango estudentizado de Tukey (HSD) para y

NOTA: Este test controla el índice de error experimentwise de tipo I, pero normalmente tiene un índice de error de tipo II más elevado que REGWQ.

Alfa	0.05
Error de grados de libertad	12
Error de cuadrado medio	1.1541E9
Valor crítico del rango estudentizado	4.75015
Diferencia significativa mínima	93169

Medias con la misma letra no son significativamente diferentes.

Tukey Agrupamiento	Media	N	cla
A	1018835	3	1
B	792046	3	2
C	682922	3	6
C	665323	3	3
D	455696	3	4
E	191142	3	5

## Respiración

Sistema SAS  
Procedimiento ANOVA

Variable dependiente: **Respiración**

Fuente	DF	Suma de cuadrados	Cuadrado de la media	F-Valor	Pr > F
Modelo	5	811485737864	162297147573	16.28	<.0001
Error	12	119655506861	9971292238.4		
Total correcto	17	931141244725			

R-cuadrado	Coef Var	Raiz MSE	y Media
0.871496	16.10858	99856.36	619895.5

Fuente	DF	Anova SS	Cuadrado de la media	F-Valor	Pr > F
cla	5	811485737864	162297147573	16.28	<.0001

Prueba del rango estudentizado de Tukey (HSD) para y

NOTA: Este test controla el índice de error experimentwise de tipo I, pero normalmente tiene un índice de error de tipo II más elevado que REGWQ.

Alfa	0.05
Error de grados de libertad	12
Error de cuadrado medio	9.9713E9
Valor crítico del rango estudentizado	4.75015
Diferencia significativa mínima	273856

Medias con la misma letra no son significativamente diferentes.

Tukey Agrupamiento	Media	N	cla
A	990727	3	6
A			
B A	802059	3	5
B			
B C	570862	3	3
B C			
B C	529614	3	4
C			
C	455921	3	1
C			
C	370190	3	2

## Figura 9: Tasa fotosintética máxima (Pmax)

Sistema SAS  
Procedimiento ANOVA

Variable dependiente: **Pmax**

Fuente	DF	Suma de cuadrados	Cuadrado de la media	F-Valor	Pr > F
Modelo	5	4886.168143	977.233629	12.77	<.0001
Error	22	1683.983336	76.544697		
Total correcto	27	6570.151480			

R-cuadrado	Coef Var	Raiz MSE	y Media
0.743692	15.10559	8.748983	57.91884

Fuente	DF	Anova SS	Cuadrado de la media	F-Valor	Pr > F
cla	5	4886.168143	977.233629	12.77	<.0001

Prueba del rango estudentizado de Tukey (HSD) para y

NOTA: Este test controla el índice de error experimentwise de tipo I, pero normalmente tiene un índice de error de tipo II más elevado que REGWQ.

Alfa	0.05
Error de grados de libertad	22
Error de cuadrado medio	76.5447
Valor crítico del rango estudentizado	4.40547
Diferencia significativa mínima	17.941
Media armónica de tamaño de celdas	4.615385

NOTA: Los tamaños de las celdas no son iguales.

Medias con la misma letra no son significativamente diferentes.

Tukey Agrupamiento	Media	N	cla
A	74.703	5	2
A			
B A	69.217	4	1
B A			
B A	66.894	5	3
B A			
B C	52.643	5	4
C			
C	42.269	4	6
C			
C	40.916	5	5

## Figura 10. Rendimiento cuántico operacional ( $\alpha$ )

Sistema SAS  
Procedimiento ANOVA

Variable dependiente:  $\alpha$

Fuente	DF	Suma de cuadrados	Cuadrado de la media	F-Valor	Pr > F
Modelo	5	0.13719938	0.02743988	47.20	<.0001
Error	12	0.00697569	0.00058131		
Total correcto	17	0.14417507			

R-cuadrado	Coef Var	Raiz MSE	y Media
0.951617	9.601240	0.024110	0.251117

Fuente	DF	Anova SS	Cuadrado de la media	F-Valor	Pr > F
cla	5	0.13719938	0.02743988	47.20	<.0001

Prueba del rango estudentizado de Tukey (HSD) para y

NOTA: Este test controla el índice de error experimentwise de tipo I, pero normalmente tiene un índice de error de tipo II más elevado que REGWQ.

Alfa	0.05
Error de grados de libertad	12
Error de cuadrado medio	0.000581
Valor crítico del rango estudentizado	4.75015
Diferencia significativa mínima	0.0661

Medias con la misma letra no son significativamente diferentes.

Tukey Agrupamiento	Media	N	cla
A	0.37807	3	2
A			
A	0.35353	3	1
B	0.25610	3	3
B			
C B	0.19343	3	5
C			
C	0.17200	3	4
C			
C	0.15357	3	6

## Figura 11. Disipación No-Fotoquímica (NPQ)

Sistema SAS  
Procedimiento ANOVA

Variable dependiente: **NPQ**

Fuente	DF	Suma de cuadrados	Cuadrado de la media	F-Valor	Pr > F
Modelo	5	0.06741034	0.01348207	9.06	<.0001
Error	24	0.03572844	0.00148868		
Total correcto	29	0.10313878			

R-cuadrado	Coef Var	Raiz MSE	y Media
0.653589	9.570672	0.038583	0.403143

Fuente	DF	Anova SS	Cuadrado de la media	F-Valor	Pr > F
cla	5	0.06741034	0.01348207	9.06	<.0001

Prueba del rango estudentizado de Tukey (HSD) para y

NOTA: Este test controla el índice de error experimentwise de tipo I, pero normalmente tiene un índice de error de tipo II más elevado que REGWQ.

Alfa	0.05
Error de grados de libertad	24
Error de cuadrado medio	0.001489
Valor crítico del rango estudentizado	4.37265
Diferencia significativa mínima	0.0755

Medias con la misma letra no son significativamente diferentes.

Tukey Agrupamiento	Media	N	cla
A	0.49130	5	1
A			
B A	0.41700	5	5
B			
B C	0.40207	5	6
B			
B C	0.39794	5	4
B			
B C	0.37654	5	3
C			
C	0.33400	5	2

## Figura 19. Fracción de complejos liberadores de oxígeno activos (CLO)

Sistema SAS  
Procedimiento ANOVA

Variable dependiente: CLO

Fuente	DF	Suma de cuadrados	Cuadrado de la media	F-Valor	Pr > F
Modelo	5	0.98014853	0.19602971	86.62	<.0001
Error	42	0.09504772	0.00226304		
Total correcto	47	1.07519625			

R-cuadrado	Coef Var	Raiz MSE	y Media
0.911600	6.939328	0.047571	0.685534

Fuente	DF	Anova SS	Cuadrado de la media	F-Valor	Pr > F
cla	5	0.98014853	0.19602971	86.62	<.0001

Prueba del rango estudentizado de Tukey (HSD) para y

NOTA: Este test controla el índice de error experimentwise de tipo I, pero normalmente tiene un índice de error de tipo II más elevado que REGWQ.

Alfa	0.05
Error de grados de libertad	42
Error de cuadrado medio	0.002263
Valor crítico del rango estudentizado	4.22179
Diferencia significativa mínima	0.071

Medias con la misma letra no son significativamente diferentes.

Tukey Agrupamiento	Media	N	cla
A	0.99846	8	1
B	0.66141	8	3
B	0.64821	8	2
B	0.62293	8	4
C	0.61184	8	5
C	0.57035	8	6



## Figura 22. Centros de Reacción Activos por Complejo Antena (RC/ABS)

Sistema SAS  
Procedimiento ANOVA

Variable dependiente: RC/ABS

Fuente	DF	Suma de cuadrados	Cuadrado de la media	F-Valor	Pr > F
Modelo	5	2.86304234	0.57260847	224.63	<.0001
Error	42	0.10706188	0.00254909		
Total correcto	47	2.97010422			
	R-cuadrado	Coef Var	Raiz MSE	y Media	
	0.963953	9.251186	0.050489	0.545752	

Fuente	DF	Anova SS	Cuadrado de la media	F-Valor	Pr > F
cla	5	2.86304234	0.57260847	224.63	<.0001

Prueba del rango estudentizado de Tukey (HSD) para y

NOTA: Este test controla el índice de error experimentwise de tipo I, pero normalmente tiene un índice de error de tipo II más elevado que REGWQ.

Alfa	0.05
Error de grados de libertad	42
Error de cuadrado medio	0.002549
Valor crítico del rango estudentizado	4.22179
Diferencia significativa mínima	0.0754

Medias con la misma letra no son significativamente diferentes.

Tukey Agrupamiento	Media	N	cla
A	1.03906	8	1
B	0.59460	8	2
B	0.54469	8	3
C	0.44614	8	4
C	0.37381	8	5
D	0.27621	8	6

### Figura 23. Flujo de Absorción de excitones por centro de Reacción del PSII (ABS/RC)

Variable dependiente: **ABS/RC**

Fuente	DF	Suma de cuadrados	Cuadrado de la media	F-Valor	Pr > F
Modelo	5	463.0095559	92.6019112	820.92	<.0001
Error	42	4.7376915	0.1128022		
Total correcto	47	467.7472474			

R-cuadrado	Coef Var	Raiz MSE	y Media
0.989871	3.935914	0.335860	8.533223

Fuente	DF	Anova SS	Cuadrado de la media	F-Valor	Pr > F
cla	5	463.0095559	92.6019112	820.92	<.0001

Prueba del rango estudentizado de Tukey (HSD) para y

NOTA: Este test controla el índice de error experimentwise de tipo I, pero normalmente tiene un índice de error de tipo II más elevado que REGWQ.

Alfa	0.05
Error de grados de libertad	42
Error de cuadrado medio	0.112802
Valor crítico del rango estudentizado	4.22179
Diferencia significativa mínima	0.5013

Medias con la misma letra no son significativamente diferentes.

Tukey Agrupamiento	Media	N	cla
A	13.3772	8	6
B	10.5407	8	5
C	9.3286	8	4
D	7.7670	8	3
E	6.7501	8	2
F	3.4359	8	1



## Figura 25. Flujo de transporte de electrones por centro de reacción del PSII (ET<sub>0</sub>/RC)

Sistema SAS  
Procedimiento ANOVA

Variable dependiente: ET<sub>0</sub>/RC

Fuente	DF	Suma de cuadrados	Cuadrado de la media	F-Valor	Pr > F
Modelo	5	4.30613093	0.86122619	347.41	<.0001
Error	42	0.10411891	0.00247902		
Total correcto	47	4.41024984			

R-cuadrado	Coef Var	Raiz MSE	y Media
0.976392	4.075165	0.049790	1.221785

Fuente	DF	Anova SS	Cuadrado de la media	F-Valor	Pr > F
cla	5	4.30613093	0.86122619	347.41	<.0001

Prueba del rango estudentizado de Tukey (HSD) para y

NOTA: Este test controla el índice de error experimentwise de tipo I, pero normalmente tiene un índice de error de tipo II más elevado que REGWQ.

Alfa	0.05
Error de grados de libertad	42
Error de cuadrado medio	0.002479
Valor crítico del rango estudentizado	4.22179
Diferencia significativa mínima	0.0743

Medias con la misma letra no son significativamente diferentes.

Tukey Agrupamiento	Media	N	cla
A	1.76633	8	6
B	1.41806	8	5
C	1.23956	8	4
D	1.04808	8	3
E	0.95835	8	2
E			
E	0.90034	8	1



## Figura 27. Máximo rendimiento cuántico para la fotoquímica primaria ( $\phi P_0$ )

Sistema SAS  
Procedimiento ANOVA

Variable dependiente: ( $\phi P_0$ )

Fuente	DF	Suma de cuadrados	Cuadrado de la media	F-Valor	Pr > F
Modelo	5	0.96747263	0.19349453	174.03	<.0001
Error	42	0.04669772	0.00111185		
Total correcto	47	1.01417035			

R-cuadrado	Coef Var	Raiz MSE	y Media
0.953955	8.364104	0.033344	0.398661

Fuente	DF	Anova SS	Cuadrado de la media	F-Valor	Pr > F
cla	5	0.96747263	0.19349453	174.03	<.0001

Prueba del rango estudentizado de Tukey (HSD) para y

NOTA: Este test controla el índice de error experimentwise de tipo I, pero normalmente tiene un índice de error de tipo II más elevado que REGWQ.

Alfa	0.05
Error de grados de libertad	42
Error de cuadrado medio	0.001112
Valor crítico del rango estudentizado	4.22179
Diferencia significativa mínima	0.0498

Medias con la misma letra no son significativamente diferentes.

Tukey Agrupamiento	Media	N	cla
A	0.66532	8	1
B	0.45547	8	2
C	0.41436	8	3
D	0.34585	8	4
E	0.29130	8	5
F	0.21966	8	6

**Figura 28. Probabilidad de que un electrón se mueve más allá de  $Q_A$  ( $\Psi_0$ )**

Sistema SAS  
Procedimiento ANOVA

Variable dependiente:  $\Psi_0$

Fuente	DF	Suma de cuadrados	Cuadrado de la media	F-Valor	Pr > F
Modelo	5	0.25781493	0.05156299	406.79	<.0001
Error	42	0.00532374	0.00012676		
Total correcto	47	0.26313868			

R-cuadrado	Coef Var	Raiz MSE	y Media
0.979768	2.687936	0.011259	0.418856

Fuente	DF	Anova SS	Cuadrado de la media	F-Valor	Pr > F
cla	5	0.25781493	0.05156299	406.79	<.0001

Prueba del rango estudentizado de Tukey (HSD) para y

NOTA: Este test controla el índice de error experimentwise de tipo I, pero normalmente tiene un índice de error de tipo II más elevado que REGWQ.

Alfa	0.05
Error de grados de libertad	42
Error de cuadrado medio	0.000127
Valor crítico del rango estudentizado	4.22179
Diferencia significativa mínima	0.0168

Medias con la misma letra no son significativamente diferentes.

Tukey Agrupamiento	Media	N	cla
A	0.557063	8	6
B	0.458913	8	5
C	0.406900	8	4
C	0.398913	8	1
D	0.357288	8	3
E	0.334063	8	2





**Figura 30. Flujo específico de transferencia de electrones desde Q<sub>B</sub> hasta PSI.  $(TR_0/RC)*(1-V_i)$**

Sistema SAS  
Procedimiento ANOVA

Variable dependiente:  $(TR_0/RC)*(1-V_i)$

Fuente	DF	Suma de cuadrados	Cuadrado de la media	F-Valor	Pr > F
Modelo	5	0.30569176	0.06113835	345.33	<.0001
Error	42	0.00743592	0.00017705		
Total correcto	47	0.31312768			

R-cuadrado	Coef Var	Raiz MSE	y Media
0.976253	2.202819	0.013306	0.604037

Fuente	DF	Anova SS	Cuadrado de la media	F-Valor	Pr > F
cla	5	0.30569176	0.06113835	345.33	<.0001

Prueba del rango estudentizado de Tukey (HSD) para y

NOTA: Este test controla el índice de error experimentwise de tipo I, pero normalmente tiene un índice de error de tipo II más elevado que REGWQ.

Alfa	0.05
Error de grados de libertad	42
Error de cuadrado medio	0.000177
Valor crítico del rango estudentizado	4.22179
Diferencia significativa mínima	0.0199

Medias con la misma letra no son significativamente diferentes.

Tukey Agrupamiento	Media	N	cla
A	0.709416	8	6
B	0.661679	8	5
C	0.637102	8	4
D	0.593076	8	3
E	0.563607	8	2
F	0.459344	8	1

### Figura 31. Probabilidad de reducción de los acarreadores intermedios ( $\delta R_0$ )

Sistema SAS  
Procedimiento ANOVA

Variable dependiente:  $\delta R_0$

Fuente	DF	Suma de cuadrados	Cuadrado de la media	F-Valor	Pr > F
Modelo	5	1.98342276	0.39668455	276.82	<.0001
Error	42	0.06018709	0.00143303		
Total correcto	47	2.04360985			

R-cuadrado	Coef Var	Raiz MSE	y Media
0.970549	3.658890	0.037855	1.034613

Fuente	DF	Anova SS	Cuadrado de la media	F-Valor	Pr > F
cla	5	1.98342276	0.39668455	276.82	<.0001

Prueba del rango estudentizado de Tukey (HSD) para y

NOTA: Este test controla el índice de error experimentwise de tipo I, pero normalmente tiene un índice de error de tipo II más elevado que REGWQ.

Alfa	0.05
Error de grados de libertad	42
Error de cuadrado medio	0.001433
Valor crítico del rango estudentizado	4.22179
Diferencia significativa mínima	0.0565

Medias con la misma letra no son significativamente diferentes.

Tukey Agrupamiento	Media	N	cla
A	1.39306	8	6
B	1.14868	8	5
C	1.02050	8	4
C			
D C	0.97385	8	3
D			
D	0.94415	8	2
E	0.72744	8	1



### Figura 33. Índice de rendimiento

Sistema SAS  
Procedimiento ANOVA

Variable dependiente: **PI**Total

Fuente	DF	Suma de cuadrados	Cuadrado de la media	F-Valor	Pr > F
Modelo	5	2.84141132	0.56828226	449.89	<.0001
Error	42	0.05305246	0.00126315		
Total correcto	47	2.89446378			

R-cuadrado	Coef Var	Raiz MSE	y Media
0.981671	21.42361	0.035541	0.165896

Fuente	DF	Anova SS	Cuadrado de la media	F-Valor	Pr > F
cla	5	2.84141132	0.56828226	449.89	<.0001

Prueba del rango estudentizado de Tukey (HSD) para PI

NOTA: Este test controla el índice de error experimentwise de tipo I, pero normalmente tiene un índice de error de tipo II más elevado que REGWQ.

Alfa	0.05
Error de grados de libertad	42
Error de cuadrado medio	0.001263
Valor crítico del rango estudentizado	4.22179
Diferencia significativa mínima	0.053

Medias con la misma letra no son significativamente diferentes.

Tukey Agrupamiento	Media	N	cla
A	0.70964	8	1
B	0.07385	8	2
B	0.05741	8	3
B	0.05410	8	6
B	0.05180	8	5
B	0.04858	8	4