



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES IZTACALA

**CARACTERIZACIÓN DEL CRECIMIENTO Y LA
ACTIVIDAD METABÓLICA DE *Chlorella vulgaris*
CULTIVADA EN PRESENCIA DE PARAQUAT (1,1'-
dimetil-4,4' dipiridilo)**

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

BIÓLOGO

PRESENTA

ROGELIO PARRA MARCELO

DIRECTOR DE TESIS

Dr. HUGO VIRGILIO PERALES VELA



Los Reyes Iztacala, Tlalnepantla de Baz, Edo. de
México, 2018



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

A mis padres Clemencia y Demetrio y a mi hermano Eduardo, por todo el apoyo que me han dado a lo largo de la vida y durante toda la carrera, agradecerles sería poco por tanto que he recibido de su parte, los amo más de lo que puedo expresar.

Agradezco especialmente a mi madre, siempre encontró el medio para hacerme una persona de bien aunque todo se viera mal, sin ti nada de esto sería posible.

No soy más que el medio por el cual los esfuerzos de mis seres amados se reflejan.

A todos los compañeros, amigos y colegas que conocí en la facultad, a Jessica, Fernando, Héctor Iván, Toyo, Carlos, Ximena, Ángeles, Ana, Jo, Iván Uriel, John, Gerardo, Memo, David, Vero, Oliver, Omar y Rodolfo, cada uno me deja un recuerdo cálido en la memoria y el anhelo de generar más vivencias, gracias por todo.

A mis queridos amigos Neftali, Toño, Gustavo, David, David Olaf, Erick y Omar, siempre es un placer verlos.

A todos los chicos del laboratorio de bioquímica que hicieron de mi estancia un gusto y de los cuales obtuve mucho aprendizaje, gracias.

Al Dr. Hugo V. Perales Vela, por no dudar en aceptarme en su laboratorio estando disponible para resolver mis dudas y tenerme tanta paciencia para concluir esta etapa, estoy profundamente agradecido. Todo alumno bajo su tutela tendrá una inmensa fuente de sabiduría y ejemplo de pasión por el conocimiento y la docencia.

A la Dra. Martha Ofelia Salcedo, siempre tuvo la disposición de ayudarme a mí y a muchos otros sin pensarlo, usted fomenta los valores necesarios para el buen desarrollo del alumno y de la sociedad en general, muchas gracias.

Al comité de revisión de este proyecto, al Dr. Hugo, la Dra. Martha, la Mtra. Gloria Garduño, y la Dra. Lucia Pavon, y el apoyo del Dr. Mandujano en el análisis estadístico del mismo, por sus conocimientos, gracias.

A la UNAM por darme la oportunidad de desarrollarme como profesional.

Agradezco las becas otorgadas por parte del Estado y el Sistema Único de Beneficiarios de Educación Superior a lo largo de la carrera y para el inicio, desarrollo y conclusión de este trabajo

Contenido

1.	Introducción.....	10
1.1.	Pesticidas	10
1.2.	Fuentes de emisión y toxicidad.....	11
1.3.	Coadyuvantes en pesticidas.....	13
1.4.	Paraquat.....	14
1.4.1	Características generales	14
1.4.2	Paraquat en la agricultura.....	18
1.4.3	Problemática sobre su toxicidad	19
1.4.4	Envenenamiento con paraquat.....	20
1.4.5	Persistencia en el ambiente	21
1.4.6	Límites máximos permisibles	22
1.5.	Paraquat en organismos vegetales.....	23
1.5.1	Resistencia a PQ	24
2.	Antecedentes.....	26
2.1.	Efecto en comunidades de microorganismos	26
2.2.	Efecto del paraquat sobre <i>Chlorella vulgaris</i>	26
2.3.	Comparación entre ingrediente activo y mezclas comerciales.....	27
2.4.	Caracterización del efecto de paraquat sobre la fotosíntesis.....	28
3.	Justificación.....	31
4.	Objetivos.....	32
	Objetivo general	32
	Objetivos particulares	32
5.	Materiales y métodos.....	33
5.1.	Organismo.....	33
5.2.	Medio de cultivo.....	33
5.3.	Protocolo experimental	33
5.4.	Variables experimentales de respuesta.....	33
A.	Crecimiento.....	33
B.	Pigmentos fotosintéticos	34

C.	Actividad fotosintética por oximetría	34
D.	Actividad fotosintética por emisión de fluorescencia	34
5.5.	Análisis estadístico.....	37
6.	Resultados y discusión.....	38
A.	Crecimiento.....	38
B.	Contenido de clorofilas y carotenoides totales	44
C.	Actividad fotosintética por liberación de oxígeno	48
D.	Rendimiento fotosintético del PSII por emisión de fluorescencia de la clorofila a	49
I.	Transporte de electrones y disipación del exceso de energía de excitación	49
II.	Análisis de la fluorescencia polifásica de la clorofila a del PSII	54
III.	Estructura y función de los centros de reacción del PSII	59
IV.	Actividad y rendimiento cuántico del PSII	63
V.	Índice de rendimiento total	69
7.	Conclusiones	70
8.	Bibliografía.....	72
9.	Apéndice.....	82

Índice de figuras y tabla

Tabla 1. Parámetros cinéticos de la prueba de OJIP (Van Hereden <i>et al.</i> , 2003)	35
Figura 1. Síntesis del bromuro de paraquat y estructura del bromuro de diquat.....	14
Figura 2. Ciclo de oxido-reducción del paraquat utilizando al PSI como donador de electrones. ...	15
Figura 3 Síntesis del dicloruro de paraquat.....	16
Figura 4. Esquema del transporte de electrones fotosintético	17
Figura 5. Sitio de donación de electrones en el complejo PSI a nivel del centroferrosulfurado F_A/F_B y reacciones derivadas de la oxido-reducción del paraquat	24
Figura 6. Representación esquemática del protocolo de Genty de fluorescencia modulada, para la obtención de qP y NPQ.	37
Figura 7. Efecto de MV y PQ en el crecimiento de <i>C. vulgaris</i> expresado en peso seco	38
Figura 8. Ciclo de toxicidad por estrés oxidante derivado de las reacciones de paraquat	39
Figura 9. Efecto de MV y PQ en la tasa de crecimiento relativo de <i>C. vulgaris</i>	40
Figura 10. Efecto de MV y PQ en el tiempo de duplicación de <i>C. vulgaris</i>	42
Figura 11. Efecto de MV y PQ en la concentración de clorofila total de <i>C. vulgaris</i>	44
Figura 12. Mecanismo de generación y defensa de EROs generadas por estrés	45
Figura 13. Efecto de MV y PQ en la concentración de clorofilas por peso seco en <i>C. vulgaris</i>	45
Figura 14. Efecto de MV y PQ en la concentración de carotenoides totales de <i>C. vulgaris</i>	46
Figura 15. Efecto de MV y PQ en la concentración de carotenoides por peso seco en <i>C. vulgaris</i> ..	47
Figura 16. Efecto de MV y PQ en la fotosíntesis medida por liberación de O_2 en <i>C. vulgaris</i>	48
Figura 17. Efecto de MV y PQ sobre el rendimiento fotoquímico máximo a la luz (o rendimiento cuántico de los centros de reacción abiertos del PSII, F_V'/F_M') de <i>C. vulgaris</i>	50
Figura 18. Efecto de MV y PQ en la tasa de transporte electrónico aparente (ETR_{AP}) en <i>C. vulgaris</i> tras 72hr de exposición.....	51
Figura 19. Efecto de MV y PQ en la relajación térmica NPQ (Non Photochemical Quenching) de <i>C. vulgaris</i>	53
Figura 20. Curva de inducción de fluorescencia de la clorofila <i>a</i> (fase rápida) y su relación con las reacciones de la cadena transportadora de electrones.....	55
Figura 21. Efecto de MV y PQ en la fluorescencia variable en <i>C. vulgaris</i>	56
Figura 22. Efecto de MV y PQ sobre la fluorescencia variable relativa de <i>C. vulgaris</i>	57
Figura 23. Efecto de MV y PQ en la fluorescencia variable relativa comparada con el control en <i>C. vulgaris</i>	58
Figura 24. Efecto de MV y PQ en la fracción de Complejos Liberadores de Oxígeno del PSII en <i>C. vulgaris</i>	59
Figura 25. Modelo simplificado del flujo energético a través del PSII, de acuerdo con la prueba OJIP.	60
Figura 26. Efecto de MV y PQ en el número de centros de reacción activos en la reducción de Q_A por complejo antena del PSII en <i>C. vulgaris</i>	61
Figura 27. Efecto de MV y PQ en el flujo de excitación absorbido por centro de reacción del PSII en <i>C. vulgaris</i>	61

Figura 28. Efecto de MV y PQ en el atrapamiento por centro de reacción que conduce a la reducción de Q_A en <i>C. vulgaris</i>	62
Figura 29. Efecto de las concentraciones de MV y PQ en el flujo electrónico por centro de reacción (ET/RC) de <i>C. vulgaris</i>	63
Figura 30. Efecto de MV y PQ en el producto cuántico máximo de la fotoquímica primaria (Φ_{PO}) de <i>C. vulgaris</i>	63
Figura 31. Efecto de MV y PQ en la probabilidad de que un electrón atrapado se mueva mas allá de Q_A (Ψ_O) en <i>C. vulgaris</i>	64
Figura 32. Efecto de MV y PQ en el rendimiento cuántico máximo para el transporte de electrones en el PSII (Φ_{EO}) en <i>C. vulgaris</i>	65
Figura 33. Efecto de las concentraciones MV y PQ en la probabilidad de que un electrón proveniente de los acarreadores intermedios reduzca a los acarreadores del lado aceptor del PSI (δR_o) en <i>C. vulgaris</i>	66
Figura 34. Efecto de MV y PQ en el rendimiento cuántico para la reducción de los últimos acarreadores del lado aceptor del PSI Φ_{R_o} en <i>C. vulgaris</i>	67
Figura 35. Efecto en el índice de rendimiento total (P_{total}) de <i>C. vulgaris</i>	69

Lista de abreviaturas

ABS	Flujo absorbido	NADPH⁺	Nicotin adenin dinucleotido fosfato en su forma reducida
ABS/RC	Flujo absorbido por centro de reacción	NPQ	Decaimiento no fotoquímico
APX	Ascorbato peroxidasa	OMS	Organización mundial de la salud
CAT	Catalasa	PAN	Pesticie Action Network
CL₅₀	Concentración letal media	POD	Peroxido dismutasa
CLO	Complejo liberador de oxígeno	POPs	Productos Orgánicos Persistentes
DL₅₀	Dosis letal media	PQ	Compuesto como fórmula comercial (paraquat)
EROs	Especies reactivas de oxígeno	Pq	Plastoquinona
ETo	Flujo para el transporte electrónico	PSI	Fotosistema I
ETo/RC	Transporte electrónico por centro de reacción	PSII	Fotosistema II
ETR	Tasa de transporte electrónico	RC	Centro de reacción
FAO	Food and Agriculture Organization	RC/ABS	Número de centros de reacción activos
FAOSTAT	Base de datos de la FAO que comprenden estadísticas de agricultura, nutrición, productos pesqueros, productos forestales, ayuda alimentaria, aprovechamiento de tierras y población.	SOD	Superóxido dismutasa
Fd	Ferredoxina	TR	Flujo atrapado
F_M	Fluorescencia máxima	TR/RC	Atrapamiento por centro de reacción
F_o	Fluorescencia a los 50 ms	USEPA	United States Environment Protection Agency
F_v	Fluorescence variable	ΔpH	Cambio del gradiente de protones transtilacoidal
F_v/F_M	Rendimiento cuántico máximo para la fotoquímica primaria	δRo	Probabilidad de que un electrón proveniente de los acarreadores intermedios reduzca a los acarreadores del lado aceptor del PSI
F_v'/F_M'	Rendimiento cuántico de la fotoquímica primaria en el estado adaptado a la luz	ΦEO	producto cuántico máximo para el transporte de electrones en el PSII
GPX	Glutation peroxidasa	ΦPO	Rendimiento cuántico para la fotoquímica primaria
GR	Glutation reductasa	ΦPSII	Rendimiento cuántico operacional del PSII
GSH	Glutation	ΦRO	Rendimiento cuántico para la reducción de los últimos acarreadores del lado aceptor del PSI
GSSG	Glutation oxidado	ψO	probabilidad de que un electrón atrapado sea movido mas allá de Q _A
i. a.	Ingrediente activo		
i. i.	Ingrediente inerte		
ICI	Industria Química Imperial conocido ahora como Syngenta		
LHC II	Complejo cosechador de luz del PSII		
MV	Compuesto como ingrediente activo (metil viológeno)		
NADP	Nicotin adenin dinucleotido fosfato		

Resumen

El herbicida paraquat se ha ocupado para la erradicación de malezas por más de 50 años ocupando un lugar difícil de sustituir, acompañado de numerosas investigaciones que comprueban el efecto negativo al ambiente y los organismos que lo componen. Sin embargo, en la mayoría de las pruebas de toxicidad realizadas sólo caracterizan el daño provocado por el ingrediente activo y sin considerar la diferencia con algún agregado comercial como los que se usan comúnmente en campo. Es por esta razón que en el presente trabajo se diferenció el efecto de paraquat como ingrediente activo, metil viológeno (MV) y cómo una mezcla comercial de paraquat llamada Dragocson (PQ) utilizando la microalga *Chlorella vulgaris* como organismo representativo de las especies no objetivo del herbicida en el medio.

Se evaluó el crecimiento, el contenido específico de pigmentos fotosintéticos, la tasa de liberación de oxígeno y la actividad fotoquímica por fluorescencia siguiendo el protocolo 121 para pruebas de productos químicos de la OCDE. Se utilizaron células en fase exponencial de cultivos de aproximadamente 72 h expuestas a las concentraciones 0(testigo), 0.5, 1, 1.5, 2 y 2.5 μM de MV y 0(testigo), 25,50, 100, 150 y 200 nM de PQ, bajo un fotoperiodo 14/10 h luz/oscuridad con iluminación de $200 \mu\text{moles} \cdot \text{m}^2 \cdot \text{s}^{-1}$ y temperatura de 20-25° C en medio mineral PCG. Se obtuvo la concentración de biomasa seca, el contenido de pigmentos fotosintéticos por extracción metanólica, la liberación fotosintética de oxígeno por oximetría, y se evaluó el transporte electrónico fotosintético por emisión de fluorescencia de la clorofila *a* del fotosistema II por medio de fluorescencia modulada (PAM) y la prueba OJIP.

Ambos compuestos afectaron el crecimiento de *C. vulgaris* con todas las concentraciones aplicadas de manera dependiente de la dosis, donde MV fue ligeramente más dañino según los valores de crecimiento aunque PQ resultó hasta veinte veces más tóxico respecto al contenido de ingrediente activo en el medio. Hubo una fuerte reducción del contenido volumétrico de los pigmentos fotosintéticos con ambos compuestos, la cual fue menos contundente al comparar la concentración de pigmentos con la biomasa obtenida, habiendo mayor efecto de MV en carotenoides y PQ sobre la concentración de clorofilas.

La liberación fotosintética de oxígeno fue suprimida con el aumento de la concentración de ambos compuestos habiendo mayores diferencias significativas entre los tratamientos de MV que entre las concentraciones de PQ. Los parámetros de fluorescencia resultaron estadísticamente más sensibles y uniformes con las dosis de PQ aplicadas siendo el rendimiento cuántico para los centros de reacción abiertos (F_V'/F_M'), el rendimiento cuántico operacional del PSII (PHIPSII) y el transporte electrónico aparente (ETR_{ap}) inhibidos por ambos compuestos. Los resultados de disipación no fotoquímica (NPQ) exhibieron tendencias variables pero con diferencias significativas entre todos los tratamientos respecto al control indicando foto inhibición causada por MV y PQ.

El análisis de la fase rápida de la curva de inducción de fluorescencia o prueba OJIP presentó múltiples alteraciones con la aplicación de ambos compuestos donde principalmente se redujo la amplitud de la fluorescencia máxima F_M . Para ambos casos se presentó un aumento en el nivel J-I relacionado con el transporte desde Q_a a Q_b señalando el aumento en la reducción de Q_a y la

oxidación del pool de plastoquinona, igualmente la afección de la fase I-P que fue correlacionada con el nivel de reducción del lado aceptor del PSI donde el efecto del herbicida es característico y se careció de evidencia de daños en el CLO. La aplicación del herbicida disminuye la cantidad de centros de reacción activos, pero dichos centros mejoran el nivel de absorción provocando mínimas modificaciones en el atrapamiento de la energía.

El rendimiento cuántico máximo para la fotoquímica primaria (Φ_{PO}) y la probabilidad de que un electrón atrapado avance más allá de Q_a (Ψ_0) disminuyeron significativamente llevando a la pérdida del rendimiento cuántico máximo para el transporte electrónico en el PSII (Φ_{EO}) con ambos compuestos. Por otra parte el efecto en la probabilidad de que un electrón proveniente de los acarreadores intermedios reduzca a los acarreadores del lado aceptor del PSI (δRO) aumento con pequeñas concentraciones de MV y se desplomo con las máximas concentraciones aplicadas, mientras la aplicación de PQ presentó un aumento más uniforme con una relación dependiente de la dosis. Finalmente el secuestro de electrones a nivel del PSI produjo que el rendimiento cuántico para la reducción de los últimos acarreadores del lado aceptor del PSI fuera mayormente afectada por PQ mostrando una tendencia dependiente de la dosis a comparación de MV que causara una reducción solamente con las máximas concentraciones aplicadas.

Aunque los daños causados por ambos compuestos parecieran similares en la mayoría de las pruebas realizadas, existieron claras diferencias que podrían atribuirse a la presencia de los aditivos en la fórmula comercial.

Los resultados encontrados concuerdan con lo reportado en la literatura (Smith & Foy, 1967; Saenz *et al.*, 1997; Frankart *et al.*, 2003; Ekmekci & Terzioglu, 2005; Eullafroy *et al.*, 2009; Qian *et al.*, 2009; Benijts-Claus & Persoone, 1975; Rodríguez *et al.*, 2012; Dayan & Zaccaro, 2012; Baltazar *et al.*, 2014) donde se describe que la formación de especies reactivas de oxígeno que interactúan tanto con los componentes de la membrana, los complejos proteína-pigmento, las enzimas antioxidantes y el nivel de traducción de genes específicos, llevaron a la pérdida del correcto funcionamiento metabólico y de los transportadores electrónicos, comprometiendo el crecimiento de la población de *C. vulgaris*, sirviendo como un sensible indicador del daño que podría causar este herbicida en cualquier presentación sobre organismos fotosintéticos con los que entre en contacto.

1. Introducción

1.1. Pesticidas

El empleo de sustancias químicas y productos naturales para el control de malezas se ha dado desde la antigüedad, pero a mediados del siglo XX el rápido desarrollo de compuestos orgánicos sintéticos con actividad selectiva sobre diversas plagas, generó un cambio radical en los procesos de la agricultura (Zimdahl, 2010).

La FAO denomina pesticida a cualquier sustancia o mezcla destinada a prevenir, destruir o controlar cualquier peste incluyendo vectores de enfermedades humanas y animales. Las especies indeseadas de plantas o animales que causan daños o interfieren en la producción, proceso, almacenaje o comercio de alimentos, productos agrícolas, madera y derivados o alimento para animales, y que pueden ser aplicados en animales para el control de insectos, arácnidos u otras plagas en o sobre sus cuerpos. Esto incluye reguladores de crecimiento, defoliantes, desecantes, químicos que evitan la caída prematura y sustancias aplicadas antes y después de la cosecha para prevenir el deterioro en almacenamiento o transporte (Zacharia, 2011).

Anualmente en el mundo se usan hasta tres millones de toneladas de pesticidas formulados de alrededor de 1,600 químicos diferentes estando presentes en áreas urbanas y rurales (Pereira, 2014). A finales del siglo XX sus ventas alcanzaron 40,000 millones de dólares anuales en todo el mundo, correspondiente a 2,800 millones de kg de ingredientes activos (i. a.) y más de 50,000 formulaciones comerciales de los cuales los países en vías de desarrollo usan cerca del 40% del total. Los principales productores y exportadores son Alemania, Estados Unidos, Inglaterra, Suiza, Francia, Japón e Italia, quienes exportan en su mayoría a países tercer mundistas pese las agencias regulatorias consideren que alrededor del 30% de tal producción no alcanzan las normas de calidad internacionales (Gómez-Arroyo *et al.*, 2011).

El aumento en el uso de pesticidas se relaciona con el surgimiento de la “revolución verde” originada en México en 1944, cuyo éxito rápidamente se propagó a todo el mundo. Entre sus ejes principales fomentó el empleo de pesticidas para disminuir los procesos de erosión, sin embargo la falta de resistencia a plagas por parte de los cultivos de alto rendimiento y las prácticas de monocultivo generó una creciente necesidad y dependencia en el control químico (Zacharia, 2011). Por esto, desde 1945 el uso de pesticidas sintéticos se ha multiplicado hasta 35 veces, por cambios en las prácticas de la agricultura y mayor exigencia en la apariencia del producto, mientras que el rendimiento de los compuestos se ha multiplicado hasta diez veces pero sin una aparente reducción de pérdidas en los cultivos (Pimentel & Burgess, 2014).

Debido a la amplia variedad de productos disponibles las clasificaciones se basan en características principales como persistencia (persistente, moderadamente persistente y no persistente), estructura química (carbamatos, piretroides, bipiridilos, etc.), la plaga destinada (rodenticidas, fungicidas y herbicidas por ejemplo) o combinaciones de estas características. Sin embargo entre las clasificaciones recomendadas por la Organización Mundial de la Salud (OMS o WHO por sus siglas en inglés) para pesticidas basados en el peligro o grado de toxicidad divide prioritariamente

entre los compuestos más y menos peligrosos según la dosis letal media (DL_{50}) o concentración letal media (CL_{50}) obtenida de la aplicación en ratas o diferentes organismos de prueba por vía oral o dérmica, aunque tal toxicidad puede modificarse por múltiples factores fisiológicos, ambientales y del producto, entre otros (Ramirez y Lacasaña, 2001).

Del consumo mundial la mayor parte es utilizada por Europa y Estados Unidos, siendo los herbicidas los más solicitados globalmente con el 47.5% de las ventas, seguido del 29.5% de insecticidas, 17.5% de fungicidas y otros pesticidas solamente contribuyen con el 5.5% (Arnab *et al.*, 2014). De acuerdo con la FAOSTAT, en México se consumieron 122,990 toneladas de pesticidas en 2009 con un mayor uso de herbicidas e insecticidas (Salazar y Aldana, 2011).

1.2. Fuentes de emisión y toxicidad

Estos compuestos desarrollados para proteger el ganado, los cultivos y al hombre suelen ser degradados por el ambiente y los organismos, sin embargo algunos pueden persistir, ser transportados o ser dañinos y acumulables (Kearney, 1975). En animales los pesticidas pueden inducir estrés oxidante, ser tóxicos por ingestión, inhalación, o absorción dérmica y pueden acumularse en tejido adiposo, células cerebrales, sistema nervioso y glándulas endocrinas e incluso en la leche en algunos mamíferos. Ciertos compuestos generan disfunciones neurológicas o psicológicas que alteran el comportamiento, pueden provocar desbalances hormonales, supresión del sistema inmune, alteraciones del sistema reproductor, genotoxicidad, desordenes de la sangre incluyendo leucemia o linfoma y anormalidades en hígado y riñones. Su presencia en el medio reduce la biodiversidad, la fijación de nitrógeno, afecta polinizadores, destruye el hábitat y afecta especies amenazadas; igualmente fomenta la generación de resistencia forzando los productores a utilizar mayor cantidad de pesticidas provocando un círculo vicioso (Saravi & Shokrzadeh, 2011).

La entrada al ambiente puede ocurrir por accidentes durante la producción de estos compuestos así como por el uso indebido o inadecuado de los productos, también por factores ambientales que alteran el ciclo del pesticida e incluso pueden presentarse en alimentos afectando al público en general (Ferrer, 2003). Regularmente el desplazamiento en el medio comienza con la distribución en campo por distintos métodos, pero la proporción de pesticida que llega a su destino resulta cuestionable ya que en muchos casos se han encontrado residuos de pesticidas a kilómetros de distancia del área de aplicación de manera variable por las barreras físicas del entorno (Martínez *et al.*, 2012). Cerca del 98% de los insecticidas y 95% de los herbicidas alcanzan un destino diferente al planeado y a pesar de las medidas regulatorias estos compuestos continúan siendo detectados en cantidades mesurables en el medio incluyendo la vida marina (Saravi & Shokrzadeh, 2011).

Otra fuente de exposición es durante la fabricación ya que por su naturaleza tóxica todo contacto con ellos es perjudicial comprometiendo al personal involucrado directa o indirectamente en su producción y uso (Hough, 2014). De igual manera las “aguas mezcladas” generadas durante la formulación, dilución, mezclado, transferencia y aplicación de pesticidas comerciales son consideradas sustancias de alto riesgo de contaminación que pueden llegar a líneas de agua y

alcanzar los recursos acuíferos (Moctezuma *et al.*, 1999). A esto se suman los remanentes de pesticidas obsoletos ya sea por que han expirado, han sido prohibidos, son productos no identificados, dañados o degradados y contenedores con pesticidas enterrados que se van acumulando con el paso del tiempo. Las condiciones en las que se resguardan estos productos suelen ser deficientes ya sea por condiciones inseguras de almacenamiento o por carencias en los procesos administrativos, haciéndolos susceptibles a filtraciones o derrames. Como consecuencia, la expansión demográfica ha forzado también a los grupos humanos a entrar en contacto con zonas que funcionaban como lugares de depósito para este y otro tipo de sustancias representando un riesgo latente (Siemonov *et al.*, 2012).

Una vez en el ambiente varios pesticidas se consideran contaminantes orgánicos persistentes (POPs por sus siglas en inglés) junto a compuestos como las dioxinas, los hidrocarburos del petróleo, solventes y plásticos cuyas cualidades químicas las convierten en moléculas altamente resistentes a la biodegradación. Ya sea por su amplio uso o por su inadecuada disposición, son xenobióticos que pueden migrar a través del suelo, aguas subterráneas y el aire yendo a la deriva (Pereira, 2014). A su paso pueden dejar residuos ligados, definidos como residuos inextraíbles e inidentificables de pesticidas que permanecen en los ácidos fúlvicos, ácidos húmicos y fracciones húmicas después de exhaustivas extracciones secuenciales con diferentes solventes y que debido a la complejidad de la porción orgánica del medio sus identidades químicas son difíciles de determinar (Kearney, 1975). Además el envejecimiento de los pesticidas en el medio altera el proceso de sorción-desorción en el suelo facilitando la formación de residuos ligados por desequilibrios fisicoquímicos en los procesos de absorción, provocando menor susceptibilidad a degradación y modificando la disponibilidad biológica de las partículas (Boivin *et al.*, 2005).

Se calcula que en México existen alrededor de 900 plaguicidas distintos, y los estados con mayor uso son Sinaloa, Veracruz, Jalisco, Nayarit, Colima, Sonora, Baja California, Tamaulipas, Michoacán, Tabasco, Estado de México, Puebla y Oaxaca, que utilizan el 80% del total. Desgraciadamente la información en cuanto al volumen, tipos de pesticidas aplicados anualmente y el grado de contaminación con productos tóxicos en la mayoría de los cuerpos de agua son prácticamente inexistentes (García y Rodríguez, 2012). Se estima que se utilizan 30 plaguicidas de 90 que están prohibidos o restringidos en los Estados Unidos, 13 de los 22 plaguicidas clasificados como perjudiciales para la salud y el ambiente de los cuales el 42% son de fabricación nacional, empleando 260 marcas de las cuales 24 están prohibidas y 13 son restringidas (Martínez-Valenzuela y Gómez –Arroyo, 2007). Esta demanda puede relacionarse a la amplia variedad de cultivos que obliga a utilizar diferentes grupos de plaguicidas y existiendo un abuso de algunos, provocando la presencia en el ambiente de concentraciones superiores a los límites establecidos. Por estas razones es necesario realizar inspecciones de la calidad de los cuerpos de agua, los organismos que los habitan y de los pesticidas utilizados por los productores con el fin de proteger el medio, la vida silvestre y la salud humana (Hernández y Hansen, 2011).

1.3. Coadyuvantes en pesticidas

Los surfactantes son aditivos compuestos de la unión de un fuerte grupo hidrófilo con uno hidrófobo que se congregan entre la interface del medio acuoso y otras fases generando espumabilidad, emulsificación y suspensión de partículas, existiendo como monómeros o polímeros mezclados con abrasivos, enzimas, conservadores, colores y perfumes, entre otros. Son utilizados en múltiples ramos industriales como sustancias orgánicas para limpiar, enjuagar y/o suavizar (en el caso de telas) debido a sus propiedades activas en superficie. Su síntesis industrial se realiza con sustratos de petróleo no renovables o sustratos químicos de base oleosa renovables seguidos de numerosas modificaciones químicas (Rebello *et al.*, 2013).

El grado de disposición y el efecto tóxico que generan suele ser ignorado o enmascarado hasta la ocurrencia de algún incidente, donde el nivel de contaminación depende de múltiples factores industriales, bióticos y del ambiente, siendo los surfactantes catiónicos de los más tóxicos seguidos de los aniónicos, anfotéricos y no-iónicos en orden descendente de toxicidad (Rebello *et al.*, 2013). Los surfactantes aumentan la eficiencia de herbicidas, reguladores de crecimiento y defoliantes ayudando a que la solución se adhiera mejor a la superficie objetivo aumentando su asimilación. Maximizan el potencial biológico de los ingredientes activos (i. a.) siendo regularmente indispensables para conservar la actividad y eficiencia en condiciones desfavorables del medio o por mala calidad del agua (Castro *et al.*, 2013).

La efectividad depende de la compatibilidad del i. a. y el aditivo en términos químicos y de proporción en el preparado, cuya dinámica varía respecto al organismo y el medio. Para su desarrollo se busca equilibrar un mayor rendimiento de los i. a. manteniendo la estabilidad física de los preparados y reducir el impacto en la salud humana y el ambiente conservando un costo de producción negociablemente redituable, siendo el cambio climático un obstáculo principal para el diseño de nuevos surfactantes (Castro *et al.*, 2013). Varios surfactantes cuentan como aditivos o incluso como “ingredientes inertes” (i. i.) anexados en el Acta Federal de Insecticidas, Rodenticidas y Fungicidas (FIFRA por sus siglas en inglés) de la regulación Estadounidense, tratando a estos compuestos con menor rigor respecto a los i. a. Aunque el calificativo “inerte” alude a un compuesto inofensivo, éstos tienen actividad biológica, tóxica y química por sí solos, donde en ocasiones la distinción entre i. a. e i. i. es inconsistente según observaciones de la Agencia de Protección al Ambiente de los Estados Unidos (USEPA por sus siglas en inglés). En promedio una mezcla pesticida contiene 86% de i. i. y en productos agrícolas hasta 50%, presentando múltiples compuestos cada uno con un propósito diferente en la preparación, pero la evaluación de cada sustancia es limitada por los términos de FIFRA. Además los i. i. raramente se especifican en las etiquetas declarando que tales datos son protegidos como información confidencial de negocios según los fabricantes o el gobierno y la solicitud para identificarlos envuelve un retraso burocrático reflejando la necesidad de esclarecer públicamente la identidad de todos los ingredientes en los pesticidas (Cox & Sorgan, 2006).

Otra problemática alarmante es que para el registro de sustancias en la USEPA se requieren 20 pruebas de toxicidad aguda de las cuales siete utilizan la mezcla comercial y el resto sólo el i. a.

abarcando problemas de mediano a largo plazo, de manera similar únicamente la mitad de las pruebas de destino ambiental y la cuarta parte de las pruebas de efectos en vida silvestre y plantas no objetivo utilizan la mezcla pesticida con aditivos llevando a subestimar el peligro que puede causar algún componente no especificado en el registro (Cox & Surgan, 2006).

En el caso del herbicida paraquat se ha visto que surfactantes catiónicos, no-iónicos e incluso algunos aniónicos aumentan significativamente la toxicidad en concentraciones adecuadas, y en pruebas de toxicidad la especie utilizada y la proporción paraquat-surfactante que se maneja es determinante para la actividad herbicida (Smith & Foy, 1967). En campo la selección adecuada del coadyuvante y su proporción para aplicarlo con paraquat es determinante según la capacidad que tengan para formar micelas más pequeñas que logren una mejor penetración de la solución en los tejidos vegetales y por tanto aumenten la toxicidad neta del herbicida (McKinlay *et al.*, 1974).

No obstante la problemática sobre los reportes de envenenamiento y muerte por paraquat también empujan a generar mezclas comerciales que reduzcan el riesgo de intoxicación o de ingesta de concentraciones mortales del compuesto, sin embargo además de los factores del propio producto, la situación laboral, económica y geográfica son limitantes en la generación de un preparado que reduzca la toxicidad donde la alternativa más sensata parecería la prohibición (Bateman, 2008).

1.4. Paraquat

1.4.1 Características generales

El paraquat se describe por primera vez en 1882 por Weidel y Rosso, sintetizado por la reacción de 4,4'-bipiridina con yoduro de metilo (aunque igualmente se puede realizar con cloruro o bromuro de metilo) (Figura 1 A). Sin embargo se reconoce como herbicida a las sales de paraquat hasta 1955 en la estación de investigación Jealott's Hill en Bracknell, Reino Unido por parte de ICI (Imperial Chemical Industries, ahora Syngenta) un año después del descubrimiento del bromuro de diquat (Figura 1 B) en 1954, y ambos compuestos formarían parte del grupo de los herbicidas bipiridilos.

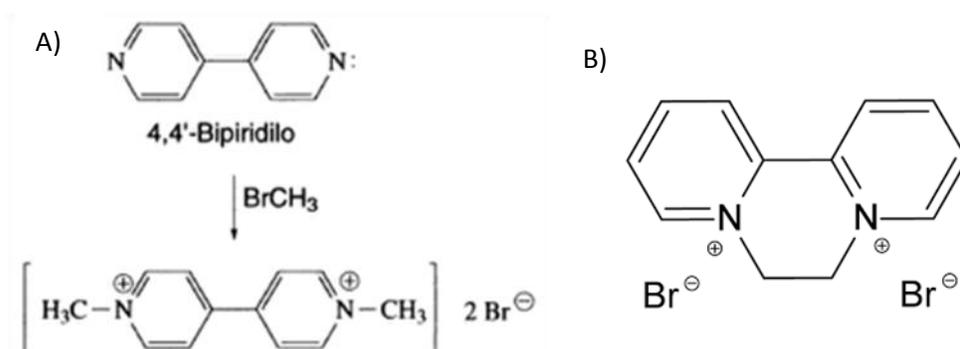


Figura 1. A) Síntesis del bromuro de paraquat y B) Estructura del bromuro de diquat

Las propiedades redox del paraquat fueron descubiertas en 1932 por Michaelis y Hill usándolo como un indicador de oxido-reducción, otorgándole el nombre de metil viológeno debido a la

donación de un electrón al ion paraquat formando un radical libre monocación estable de un característico color azul o violeta (Figura 2)(Dinis-Oliveira, 2007). Paraquat y diquat pueden asumir una configuración coplanaria altamente conjugada que brinda estabilidad a los electrones desacoplados en sus formas reducidas siendo vital para la reducción del O₂. Aunque existen otras configuraciones químicamente similares solo las configuraciones 4,4' (paraquat), 2,2' (diquat) y 2,4' han resultado fitotóxicas (Fuerst & Norman, 1991).

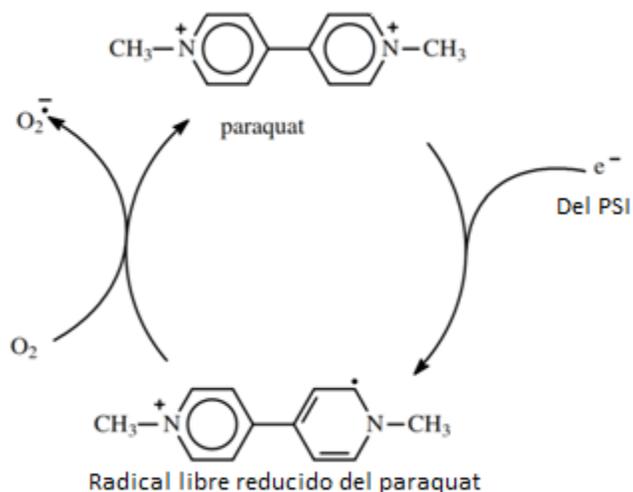


Figura 2. Ciclo de oxidación-reducción del paraquat utilizando al Fotosistema I como donador de electrones.

Como dicloruro presenta una masa molar de 257.2 g/mol y como dicatión de 186.3 g/mol con números de registro CAS (Chemical Abstract Service) 1910-42-5 y 4685-14-7 respectivamente. En general tiene una electronegatividad de -0.446 V y en su forma más común de dicloruro presenta una presión de vapor de 1×10^{-8} kPa a 25°C, punto de fusión superior a 400°C y punto de descomposición a 340°C, solubilidad en agua de 620 g/l a 20°C siendo completamente dissociado en soluciones acuosas. Es hidrolíticamente estable bajo condiciones ácidas (pH 5), neutras (pH 7) y alcalinas (pH 9) y aún después de 30 días a 25 y 40 grados centígrados. Su vida media ambiental en agua según condiciones europeas se ha calculado entre dos y 820 años, dependiendo de la irradiación solar y la profundidad del agua (FAO, 2006).

Químicamente la estructura del paraquat está formada de dos anillos de piridina cuaternarios unidos de manera que sus átomos de nitrógeno portan las cargas repeliéndose diametralmente. La adición del radical metil (en posición para o paralela) a cada núcleo de nitrógeno en el anillo de piridina promueve el cambio de ambos anillos a amonio cuaternario, por ende el compuesto es un bi-piridilo cuaternario para-sustituido, de ahí el nombre de paraquat. Existen diferentes métodos para su producción siendo el más común por acoplamiento de la piridina en presencia de sodio en amonio anhidro seguido de la formación cuaternaria del 4,4'-bipiridil con un exceso de cloruro de metilo para obtener dicloruro de paraquat en su forma oxidada (Figura 3).

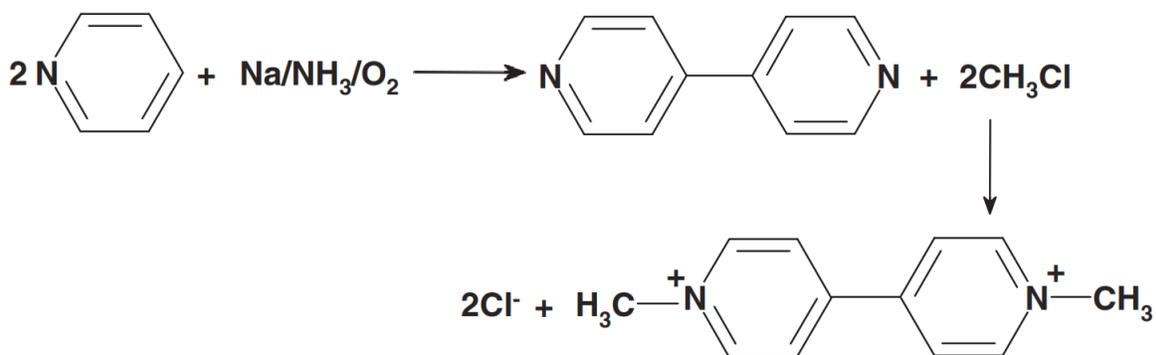


Figura 3 Síntesis del dicloruro de paraquat (Sacado de Dinis-Oliveira, 2007).

En agosto de 1962 el paraquat (ión 1,1'-dimetil-4,4'bipiridilo) es introducido al mercado como herbicida por la Plant Protection Division Ltd. de ICI siendo de los únicos bipiridilos comercializados además del diquat, aplicado comúnmente como sales de dicloruro (Dinis-Oliveira, 2007). Sobre plantas las sales de bipiridilo en general causan la rápida abrasión de los tejidos verdes tras ser expuestas a la luz con una ligera translocación por la rápida desecación, por esto las partes subterráneas no son afectadas y usualmente rebrotan (Bromilow, 2003).

La acción de estos dicaciones activos en solución se ve en horas o menos de un día actuando solo al ser absorbidos por el follaje y presuntamente sin tener gran actividad en el suelo debido a su completa absorción. Se disocian casi totalmente en solución y su acción herbicida se debe al ion positivo bipiridilo que se reduce al atrapar un electrón del fotosistema I (PSI) formando un radical relativamente estable que sigue reaccionando (Figura 2 y 4). Este radical produce especies reactivas de oxígeno (EROs) como radical superóxido, peróxido de hidrógeno, radical hidroxilo y oxígeno singulete, que reaccionan a su vez con las membranas celulares en primera instancia provocando la muerte celular (Zimdahl, 1993).

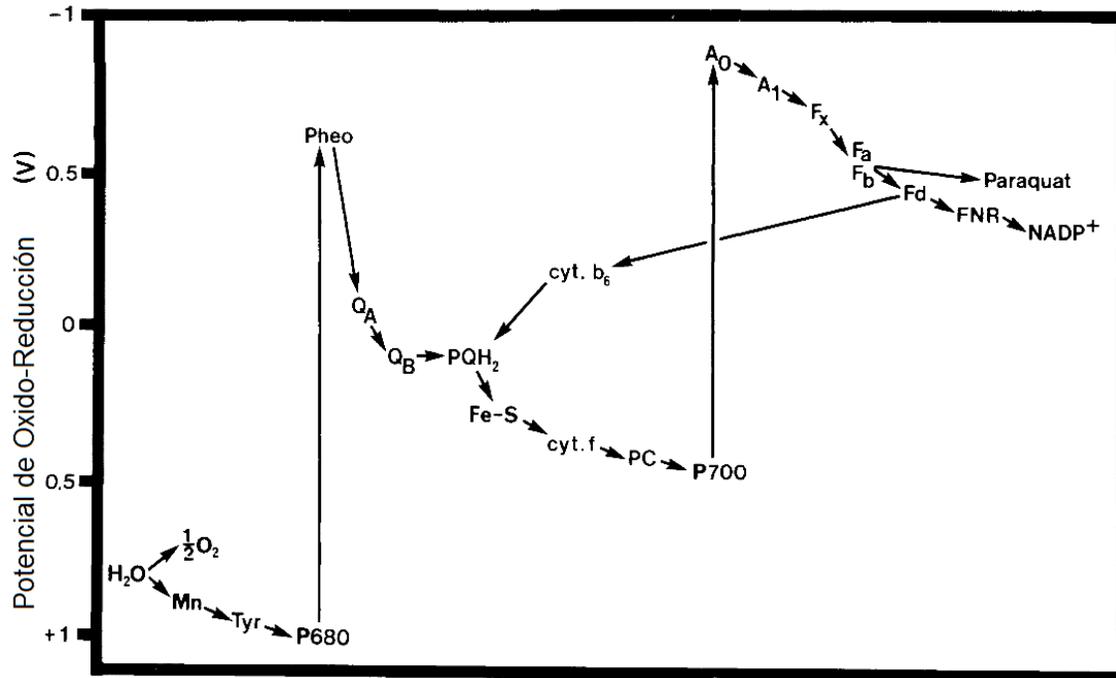


Figura 4. Esquema del transporte de electrones fotosintético. Mn, el manganeso de estado S de la enzima liberadora de oxígeno; Tyr, residuo de tirosina 160 de la proteína D1; P680, dímero de clorofila *a* del centro de reacción; Pheo, feofitina, (clorofila *a* sin magnesio); QA, plastoquinona unida a la proteína D2; QB, Plastoquinona unida a la proteína D1; PQH₂, Plastohidroquinona (plastoquinona reducida); Fe-S, Proteína ferrosulfurada tipo Rieske; cyt f, citocromo f; cyt b₆, citocromo b₆; PC, plastocianina; P700, centro de reacción del PSI, probablemente un dímero de clorofila *a*; A₀, probablemente un monómero de clorofila *a*; A₁, probablemente una filoquinona (vitamina K-1); Fx, Fa/Fb, proteínas ferrosulfuradas no hemo unidas a membrana; Fd, ferredoxina; FNR, ferredoxin-NADP⁺ oxidoreductasa; NADP⁺, nicotinamida adenin dinucleotido fosfato. (Tomado de Fuerst y Norman, 1991).

Las mezclas comerciales de paraquat suelen variar en cada país, estando típicamente disponibles como soluciones concentradas del 10% al 30% según las instrucciones de los fabricantes. La solución asperjada, correctamente diluida debe contener no más de 0.05 a 0.2% del ion para uso agrícola o 2.5 o 5% en polvo (p/p) para uso doméstico. Aunque las mezclas comerciales son regularmente neutras pueden llegar a ser irritantes o corrosivas sobre ciertos materiales y el concentrado puede contener detergentes alifáticos para mejorar la entrada del paraquat en las células y por tanto su efecto, utilizando regularmente surfactantes no iónicos o catiónicos ya que los surfactantes aniónicos inactivan su toxicidad e igualmente es incompatible con agentes humectantes alquilaryl-sulfonato y sustancias fuertemente oxidantes. Es estable en soluciones ácidas o neutras pero es rápidamente hidrolizado en soluciones muy alcalinas (pH mayor a 12); en su contenedor original y bajo condiciones normales su vida de anaquel es indefinidamente larga y también es estable a temperaturas superiores del rango general del medio (Dinis-Oliveira, 2007).

Su comercialización es comúnmente un concentrado de 200 g de dicloruro de paraquat por litro como un líquido café inodoro. Los requerimientos mínimos exigen que se le añada un agente repelente al olfato (un derivado de piridinas) para prevenir el envenenamiento accidental o criminal, un tinte azul verdoso además de un componente emético. Es a veces vendido en una mezcla con diquat u otras sustancias, pero a pesar de estas medidas las intoxicaciones aun son reportadas (Aggrawal, 2006).

1.4.2 Paraquat en la agricultura

Hoy en día el mayor productor es China con 100,000 toneladas anuales y alrededor de 100 países siguen protegiendo sus cultivos con este compuesto a pesar de la prohibición en más de 30 países debido a su alta toxicidad (Augustyniak *et al.*, 2015). Es evidente que este compuesto ocupa uno de los primeros lugares en el mercado siendo de los más utilizados a pesar de numerosas acciones regulatorias en su contra y la generación de resistencia en diferentes especies de malezas (He *et al.*, 2014). Actualmente se encuentra fuera de patente y se vende bajo una variedad de nombres por un sinnúmero de manufacturas, solo o mezclado con otros compuestos como herbicida no selectivo de plantas perennes y anuales. A pesar de usarse en rotación con el glifosato (otro herbicida ampliamente solicitado), el paraquat mantiene una economía estable por que el nicho que ocupa es difícil de sustituir (Deloitte, 2013).

En el 2001 sus ventas en los 46 mercados principales fueron de 386.2 mdd y de 314.9 mdd tan solo en los primeros 12 mercados, siendo en su mayoría países en vías de desarrollo. La empresa Syngenta es por mucho el principal productor acaparando al menos 50% del mercado, pudiendo ser este porcentaje mucho mayor a pesar de que la patente ya no está protegida (Isenring, 2006). Esta empresa no hace pública la información relativa al producto de ventas y ganancias por concepto de ventas de paraquat en países en desarrollo por considerarla “información sensible” en términos comerciales, no obstante el mercado de tales países es determinante en las ganancias que genera (Madeley, J. 2003).

El paraquat es promovido por la compañía como una alternativa para evitar el proceso de labranza del suelo permitiendo la siembra directa, pero el empleo de este y otros pesticidas tóxicos para la reducción el arado no es una solución sensata para mantener la fertilidad del suelo. El empleo de pesticidas y monocultivos en la agricultura industrial son de las mayores causas de la degradación del suelo y los cuestionamientos hacia Syngenta sobre las consecuencias negativas que ignora, los efectos a largo plazo y la manera en que piensa proceder en busca de soluciones van en aumento (Lebrecht & Meienberg, 2014). En México, el paraquat fue introducido en 1969 y a la fecha a pesar de su alta toxicidad es de los compuestos más utilizados para el control de malezas de hoja ancha y pastos (Landrigan *et al.*, 1983), ocupando desde hace años uno de los primeros lugares en ventas (Albert, 2005), principalmente debido a que su uso es autorizado pese las prohibiciones internacionales para su empleo (Muñoz y Ávila, 2005).

En México el empleo de paraquat es restringido, lo que implica que para su adquisición se solicita la recomendación escrita de un técnico oficial o privado con autorización del gobierno federal, aplicando y manipulando el producto bajo la supervisión y responsabilidad de dicho técnico, pero en la mayoría de los casos no se siguen estas normas (Bustamante, 2007).

El paraquat es usado en cultivos perennes como plátano, cacao, café y palma africana, en cultivos anuales como maíz en siembra directa o mínima labranza, en forestales, y como defoliante de algodón, soya y caña de azúcar entre otros (Isenring, 2006). En los años ochenta se reconoce el empleo de grandes cantidades de paraquat para la mitigación de plantas estupefacientes en una acción conjunta del gobierno de los Estados Unidos por medio de aplicaciones aéreas (Gomez-Rojas, 1999; Espíndola-Santos, 1999).

1.4.3 Problemática sobre su toxicidad

La clasificación de la OMS se basa principalmente en la toxicidad aguda dérmica y oral en ratas dado que éstos son procedimientos estándar en toxicología. La mayoría de las clasificaciones son hechas con base a la dosis letal oral y la toxicidad dérmica es considerada debido a que la mayor proporción de la exposición total es dérmica (Bolognesi & Merlo, 2011). El paraquat es clasificado por la OMS de acuerdo a su toxicidad como aguda clase II o “moderadamente peligroso”, pero en este sentido difiere de muchos herbicidas que son menos tóxicos (WHO, 2005).

Sin embargo los datos de toxicidad por bioensayos en animales que utilizan las agencias regulatorias no es consistente. Mientras que la OMS estipula una DL_{50} de 150 mg/kg en ratas como la base para su clasificación, la USEPA clasifica la toxicidad aguda oral por paraquat como categoría II, moderadamente tóxico a partir de 283 y 344 mg/kg en ratas hembras y machos respectivamente, haciéndola una clasificación menos rigurosa.

Además la toxicidad aguda en otros mamíferos como conejillos de indias (22-30mg/kg), monos (50mg/kg), gatos (40-50 mg/kg) y perros (25-50mg/kg) es mucho menor y en humanos la dosis letal media registrada es de 17mg/kg pero incluso dosis menores pueden ser fatales para niños, por lo cual la clasificación estándar con ratas debe ser subestimada (Wasseling *et al.*, 2001).

Por otro lado regularmente las pruebas para perfiles toxicológicos, mutagénicos y ecotoxicológicos de la FAO y la OMS utilizan el compuesto solamente como ingrediente activo, sin considerar el efecto conjunto que puede provocar en formulación con los surfactantes y aditivos que los fabricantes añaden y varían de empresa en empresa, por lo que es necesario hacer un estudio paralelo sobre la toxicidad del paraquat en forma de i. a. y fórmula comercial.

Actualmente el paraquat está prohibido en 32 países incluyendo los 27 de la Unión Europea después de que en 2007 el tribunal de primera instancia anuló la autorización de su uso después de la presión ejercida por Suecia debido a faltas de protección de la salud humana especialmente relacionadas a exposición operacional, riesgo de enfermedad de Parkinson y deficientes pruebas en animales.

Algunos de los países donde está prohibido son: Suecia, Finlandia, Hungría, Austria, Dinamarca, Eslovenia y Alemania, Kuwait, Camboya, Costa de marfil, Siria, Emiratos Árabes Unidos Noruega y Suiza. Su uso es restringido en Colombia, Filipinas, Indonesia, Corea del Sur, Uruguay, Estados Unidos, Belice, Chile, Costa Rica y Sri Lanka. A pesar de esto, el paraquat aun no se incluye en el Convenio de Rotterdam aunque 14 países ya lo han solicitado.

El paraquat se encuentra en la docena sucia de la PAN (Pesticide Action Network) y de pesticidas altamente peligrosos, identificado como un pesticida que ha causado envenenamientos fatales por el Foro Intergubernamental de Seguridad Química. En vista de la prolongada falta de acción regulatoria por las instituciones oficiales, numerosas organizaciones no regulatorias han tomado acción para prohibir el uso del paraquat por el riesgo que representa (Watts, 2011). En México recientemente un grupo de organizaciones y académicos han solicitado al gobierno de la republica que ciertas formulaciones de paraquat se enlisten como plaguicida extremadamente peligrosa en

el anexo III del convenio de Rotterdam. Esto con el fin de acatar los lineamientos internacionales en relación a este herbicida, para demostrar el empeño de nuestro país de mejorar las condiciones ambientales y la seguridad de los trabajadores del campo.

1.4.4 Envenenamiento con paraquat

Existen numerosos casos de afecciones en trabajadores de formulaciones de paraquat, presentando altos niveles de lipoperoxidación lipídica y careciendo de tratamiento o control de la presencia del compuesto en el ambiente de trabajo (Ranjbar *et al.*, 2002). Syngenta es parcialmente responsable por sus ineficientes programas de seguridad y por negarse a limitar las ventas o sustituir sus productos más peligrosos. La empresa viola los derechos humanos elementales según la declaración de Berna al vender paraquat en países sub-desarrollados, donde el empleo y número de intoxicaciones es alarmante (Lebrecht & Meienberg, 2014).

En Centroamérica el paraquat es el primer compuesto relacionado a intoxicaciones laborales agudas según reportes a cargo de los servicios de vigilancia epidemiológicos (Bustamante, 2007). Esto puede ser consecuencia de que ningún país de tal región prohíbe el uso agrícola del pesticida a excepción de aspersiones aéreas, sin embargo el uso común de aplicadores conlleva a situaciones de riesgo de intoxicación accidental del trabajador o personas cercana a ellos (Wasseling *et al.*, 2001). En Papúa Nueva Guinea y Costa Rica hay reportes de muertes, lesiones y enfermedades por paraquat debido a ingestión, absorción dérmica o contacto con los ojos (Aggrawal, 2006), en el Reino Unido, Estados Unidos y América Latina se han reportado intoxicaciones siendo paraquat de los principales compuestos referenciados (Mohammadi-Bardbori & Ghazi-Khanzari, 2008), incluso en México hay casos esporádicos de intoxicación (Hernández y Martínez, 2000).

Por otra parte el empleo con fines suicidas documentado por años ha promovido que diversas instituciones exijan su regulación en diferentes países (PAN Germany, 2003), donde la mayoría de los casos se citan en Asia, registrando de 1,200 a 1,500 muertes en la década de los 80 solo en Japón (Mohammadi-Bardbori & Ghazi-Khanzari, 2008).

La ingestión de paraquat genera quemaduras en la parte superior del tracto digestivo, fallo multiorgánico con pulmones como objetivo principal e hígado, en menor grado el sistema nervioso central, corazón, glándulas suprarrenales, y musculo. Según la dosis, la muerte se da por fallo respiratorio por edema pulmonar en días posteriores y por fibrosis pulmonar al cabo de un mes (Wasseling *et al.*, 2001).

El tratamiento clínico de la intoxicación está bien documentado con protocolos específicos, sin embargo no existe una cura o antídoto definitivo, donde la efectividad del tratamiento es mayor en ingestiones leves. La dosis letal mínima estimada para humanos es 10-15 ml en concentrado, con tres fases clínicas según la porción ingerida y el cuadro clínico: a) intoxicación leve, dosis menores a 20 mg/kg produciendo síntomas leves con posible recuperación; b) intoxicación moderada-severa, dosis de 20 a 40 mg/kg de peso asociada con daño hepático, renal y pulmonar fulminante y c) intoxicación fulminante, dosis superior a 50 mg/kg de peso, causando la muerte en menos de 72 horas (Hernandez *et al.*, 2008). El pronóstico correcto y tratamiento inmediato son

clave en la supervivencia, pero en muchos países las intoxicaciones resultan mortales por la falta de material y conocimiento necesario para la rápida atención de los pacientes (Goudarzi *et al.*, 2002).

El efecto específico en pulmón se atribuye a la acumulación selectiva en células alveolares por captación activa de un sistema de transporte específico para diaminas. Los principales cambios del parénquima pulmonar es la destrucción de las células epiteliales alveolares, hemorragias capilares y edema pulmonar seguido de proliferación de fibroblastos intersticiales y finalmente fibrosis difusa en un lapso de dos semanas (Manno, 1996). También participa en el sistema redox aceptando electrones de los complejos respiratorios (I II III y IV) generando una rápida reacción con oxígeno molecular para formar radical superóxido en los sistemas enzimáticos microsomales y toxicidad en mitocondrias. Las especies reactivas producen peroxidación lipídica de las membranas aumentando su rigidez, provocando fragilidad osmótica, disminución de los componentes mitocondriales y reduciendo la sobrevivencia mitocondrial (Mohammadi-Bardbori & Ghazi-Khanzari, 2008).

Por otra parte la exposición crónica a paraquat es un posible factor etiológico para la enfermedad de Parkinson induciendo estrés oxidativo en el cuerpo y alteraciones del metabolismo mitocondrial, manifestado a través de cambio en los niveles energéticos de las células (Coman *et al* 2013; Sabri & Spencer, 2009). El compuesto es tomado por el cerebro vía transporte de aminoácidos con una excreción promedio del 60-70% de la dosis ingerida, siendo ligeramente metabolizado y expulsado sin cambios en orina y heces. Es aparentemente no teratogénico bajo régimen de pruebas estándar, pero altas dosis inyectadas en ratas y ratones preñados a diferentes etapas causaron toxicidad maternal significativa (Gupta, 2014).

1.4.5 Persistencia en el ambiente

Muchos trabajos se han realizado para conocer la persistencia del paraquat en el ambiente, pero los resultados obtenidos varían en el tiempo obteniendo diversas conclusiones por factores independientes de la investigación o relacionados a fenómenos del medio (Magnus *et al.*, 1985). En cuanto a la presencia en suelo Mbuk y colaboradores (2009) argumentan que con la aplicación de paraquat se suprime la lixiviación de iones metálicos como el hierro y magnesio, presuntamente porque paraquat puede formar complejos con estos iones evitando su liberación a la fase líquida además de promover la lixiviación del calcio en el perfil del suelo. Sebiomo y colaboradores (2012) describen que el paraquat en mezcla con otros herbicidas reduce la humedad del suelo y disminuye la cantidad de iones de Na y Ca disponibles y aumentan los iones de K, Mg, Fe y Zn, demostrando que el herbicida puede reaccionar con otros compuestos o con los minerales cambiando su disponibilidad para los organismos del suelo.

En cuerpos de agua la alta solubilidad del paraquat hace que su aplicación signifique un riesgo potencial de contaminación, siendo detectado en aguas superficiales y potables con una creciente necesidad de reducir su presencia en fuentes de agua alrededor del mundo. Esto se complica ya que la sorción-desorción de cada compuesto es distinta y cambia el nivel de transporte, degradación, volatilización y bio-acumulación en el medio y los organismos (Ait *et al.*, 2013).

El arrastre de paraquat hacia aguas subterráneas puede suceder por el transporte vertical en el suelo, facilitado por la materia orgánica disuelta o arcilla coloidal dispersa, mientras la presencia detectada en agua potable se debe a que pequeñas dosis logran superar algunos procesos de tratamiento y logran alcanzar las líneas de distribución poniendo en peligro a sus consumidores (Santos *et al.*, 2013), por lo cual continuamente se desarrollan métodos capaces de detectar con mayor precisión cantidades menores del herbicida en agua.

Entre los procesos utilizados se encuentran materiales como biopelículas de quitosán y alginato, arcillas finas como la bentonita para la desorción del herbicida en el medio y procesos fisicoquímicos como la descomposición electroquímica y cromatografía líquida (Sgarbi *et al.*, 2012; Ait *et al.*, 2013; Cartaxo *et al.*, 2015; Taguchi *et al.*, 1998).

Sin embargo, existen reportes como el de Magnus (1985) que sostienen que el paraquat es mínimamente transportado en agua, esencialmente ausente de los organismos acuáticos y su interacción con otros herbicidas no afecta la toxicidad, bio-acumulación o magnificación ecológica de los solutos. Pero estos estudios regularmente son simulaciones de impacto leve en el uso de paraquat o con aplicaciones irregulares a lo largo de un tramo de aplicación, dando oportunidad a que la estimación de este u otro compuesto en el ambiente sea sesgado.

También se ha visto que el paraquat puede ser asimilado por microorganismos del suelo. Imai y Kawatsuka (1989) encontraron especies de hongos y levaduras capaces de degradar el paraquat de suelos con aplicaciones continuas a lo largo de 20 años mediante un proceso dependiente de los nutrientes del suelo, liberando CO₂ y generando monoquat y compuestos similares menos persistentes. También Katayama y Kuwatsuka (1992) descubrieron algunas cepas de bacterias en el suelo que ayudan a reducir la concentración del herbicida pese a las constantes aplicaciones a lo largo de varios años.

No obstante la persistencia y disponibilidad de paraquat en cualquier suelo puede variar por la concentración utilizada y la proporción de las partículas formadoras del suelo, donde los suelos arenosos suelen representar un mayor riesgo de drenaje y fitotoxicidad tras aplicaciones de paraquat (Gomez-Rojas, 1999).

1.4.6 Límites máximos permisibles

Para los estándares europeos, la concentración máxima permisible para pesticidas individuales (incluyendo paraquat) en agua potable es de 0.1 µg/l⁻¹ y de 1-3 µg/l⁻¹ para aguas superficiales (Ait *et al.*, 2013), igualmente la USEPA tiene niveles máximos de contaminación para diquat y paraquat en agua potable de 20 y 3 µg/l⁻¹ respectivamente (Taguchi *et al.*, 1998) mientras el registro de límites máximos permisibles en Canadá es de 10 µg/l⁻¹ (Hansen *et al.*, 2013).

No obstante existen reportes sobre la presencia de paraquat y otros compuestos en muestras de canales de irrigación, ríos y lagos de la comunidad Valenciana en España, presentando concentraciones de 3.95 µg/l⁻¹, superior al límite de España y Europa (Fernández *et al.*, 1998). Peor aún en Tailandia se han detectado niveles entre 1.5 y 18.9 µg/l⁻¹ en muestras de agua superficial y de 9.3 y 87 µg/l⁻¹ en muestras subterráneas, superando por mucho los límites internacionales

establecidos (Amondham *et al.*, 2006), demostrando que es necesario hacer mas evaluaciones de la presencia del paraquat en los países que permiten su aplicación.

Desafortunadamente en México no existe regulación en la NOM 127- SSA-1994 de Salud ambiental sobre agua para uso y consumo humano ni en sus últimas modificaciones o en el proyecto NOM México para el caso de paraquat (Hansen *et al.*, 2013), solo existe un registro en la NOM-232-SSA1-2009 referente a requisitos comerciales de productos agropecuarios y similares, catalogando al paraquat como altamente tóxico para animales terrestres de sangre caliente en la categoría de peligro de toxicidad aguda 2. En términos laborales se menciona en la NOM 010 STPS 1999 sobre agentes químicos contaminantes del ambiente laboral con un límite máximo permisible de exposición en promedio ponderado en tiempo (LMPE-PPT) de 0.5 mg/m³ como polvo total y de 0.1 como fracción respirable en las jornadas de trabajo.

A pesar de la falta de recursos administrativos en torno al paraquat, México ha firmado varios instrumentos internacionales que contribuyan a la eliminación del uso de este y otros plaguicidas prioritarios, ya sea por su toxicidad, persistencia, potencial de bio-acumulación y movilidad. Entre estos convenios destaca el Código Internacional de Conducta de la Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación, los Planes de Acción Regional de Manejo Adecuado de Sustancia Químicas que la Comisión para la Cooperación Ambiental de América del Norte y el convenio de Estocolmo.

Igualmente es necesaria una evaluación del riesgo potencial de encontrar rastros de paraquat en alimentos exportados de países donde aún se utiliza, por lo que en la unión americana monitorean muestras de alimentos marcando límites según el producto. Como ejemplo, la presencia en pequeñas dosis de paraquat en jugos cítricos se da por hecho con una detección de hasta 2.01 x10⁻⁸ mol /L de PQ estando dentro de los límites. La presencia en jugo de naranja comercial como resultado de contaminación de la materia prima abarca rangos de hasta 6.66 mol/L x10⁻⁵ y para cítricos en general el valor máximo llega hasta 20 µg/kg, pero las mediciones pueden ser alteradas por compuesto similares (diquat) incluso a concentraciones del mismo orden del paraquat (Farahi *et al.* 2015).

1.5. Paraquat en organismos vegetales

El principal objetivo del paraquat en células vegetales es el fotosistema I (PSI) en la membrana del tilacoide de los cloroplastos (figura 5A), y las reacciones derivadas del herbicida se describen a continuación (figura 5B). 1) El paraquat entra como una solución catiónica divalente (PQT⁺⁺) cuyo potencial redox (-446 mV) le permite aceptar electrones del centro ferrosulfurado del PSI F_a/F_b (-560 mV) quedando en su forma reducida PQT⁺. 2) PQT⁺ a su vez reduce oxígeno molecular (O₂) a superóxido (O₂⁻) y PQT⁺⁺ es regenerado, por eso sólo cantidades catalíticas de PQ⁺⁺ necesitan ser asociadas con el PSI para ser fitotóxico. 3) Mientras tanto la superóxido dismutasa (SOD) cataliza la conversión de O₂⁻ a peróxido de hidrogeno (H₂O₂) y oxígeno molecular nuevamente (O₂) e igualmente 4) existe una espontanea reacción de H₂O₂.con. O₂⁻ generando O₂, radical hidroxilo (OH[·]) y ion hidroxilo (OH⁻). 5) PQ⁺ se condensa también con H₂O₂ para producir espontáneamente PQT⁺⁺, OH[·] y OH⁻. 6) Presuntamente el OH[·] puede también ser producido por la catálisis de Fe⁺⁺ con

H⁺ y H₂O₂ en la reacción de Fenton generando agua y Fe⁺⁺⁺ dependiendo de las concentraciones catalíticas de los sustratos (Fuerst & Norman, 1991).

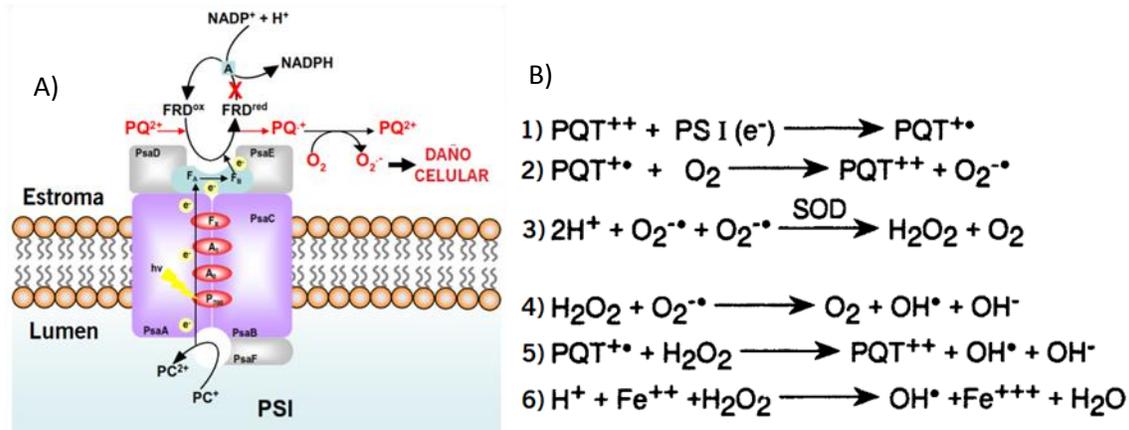


Figura 5. A) Sitio de donación de electrones en el complejo PSI a nivel del centroferrosulfurado F_A/F_B y B) reacciones derivadas de la oxidación-reducción del paraquat (Fuerst & Norman, 1991; Dinis-Oliveira, 2007).

De acuerdo con Benina (2015) las EROs generadas se abren paso dentro de las células por lipoperoxidación membranar, aquí pueden provocar modificaciones más allá del cloroplasto induciendo cambios en los niveles de expresión genética por errores de traducción del RNAm y dichos errores pueden variar según el tipo celular con el que el paraquat actúa.

Teóricamente el transporte del compuesto es moderado, teniendo particular movimiento hacia el sistema vascular donde el nivel de absorción en los tejidos no supera el cinco por ciento a concentraciones micromolares en plantas superiores (Funderburk & Lawrence, 1964). Sin embargo existen reportes donde puede afectar las regiones no clorofílicas de la planta limitando el crecimiento (Jordan *et al.*, 1966).

1.5.1 Resistencia a PQ

La generación de resistencia a paraquat es consecuencia de su uso excesivo, hasta 1990 se reportaron 13 especies de malezas que generaron resistencia al paraquat y diquat (Lebaron, 1990). Para el 2011 se reportan tres especies resistentes del genero *Conyza* (Asteraceae) y 21 especies de malezas dicotiledóneas y monocotiledóneas, esto es sorprendente debido a que la presión de selección para la resistencia se relaciona a cortos periodos de tiempo. Entre los mecanismos de resistencia se describe el secuestro de EROs y aumento en la expresión de enzimas antioxidantes como la SOD. Comúnmente las plantas generadas transgénicamente se han logrado por sobre-expresión de genes codificantes para enzimas antioxidantes u otros genes que faciliten su secuestro (Duke & Dayan 2011).

Sin embargo existen sistemas de resistencia a paraquat que son consecuencia de la acción de enzimas antioxidantes o son modificaciones fisiológicas originadas en plantas tratadas con el herbicida, de la revisión de Szigeti y Lehoczki (2003) se citan algunos mecanismos.

1) Se ha encontrado resistencia a paraquat por pre-exposición a compuestos como la atrazina, un herbicida que se aplica solo o en compañía de paraquat. Esta resistencia se relaciona con el aumento de la actividad del ciclo de las xantofilas y la estimulación del recambio de componentes importantes de la cadena de transporte electrónico como la proteína D1, los cuales son puntos clave para la actividad del paraquat.

2) En algunas especies resistentes la conservación de la integridad de las membranas del tilacoide para evitar el desacoplamiento de la clorofila disminuye el efecto del paraquat. El alargamiento del espacio intratilacoidal provoca el alejamiento de unas membranas con otras, además de una mayor proporción de ácido Δ^3 -hexadecanoico permite que los complejos cosechadores de luz del PSII (LHCII) sean mejor conservados o más sustituidos con mayor rapidez respecto a organismos susceptibles.

3) En algunos organismos el paraquat comparte afinidad con transportadores de poliaminas (putrisceno y espermidina) en la membrana celular, ocurriendo la resistencia por medio de inhibición competitiva de altas concentraciones de poliaminas que reducen la entrada del paraquat en las células, o bien estas poliaminas actúan como antioxidantes en contra del herbicida.

4) Los mecanismos dependientes de energía que pueden promover el aislamiento de las moléculas de paraquat hacia sitios de inactividad dentro de la célula permitiendo tolerar mayores concentraciones del herbicida.

Relacionado a este último inciso, Yu y colaboradores (2010) reportan la capacidad de acumular ciertas concentraciones del pesticida en el protoplasto foliar en *Lolium rigidum*, indicando mecanismos de secuestro vacuolar a manera de resistencia contra el herbicida.

2. Antecedentes

2.1. Efecto en comunidades de microorganismos

Se reconoce que el paraquat es mayormente persistente en suelos como el hidrosol o en los sedimentos acuáticos con los que tiene contacto (Frank & Comes, 1967), representando particular peligro a los productores primarios como las microalgas. Way y colaboradores (1971) reportan que el uso de este pesticida para la erradicación de malezas acuáticas altera la dinámica ambiental principalmente entre el fitoplancton y microorganismos heterótrofos, y a pesar de no tener efecto inmediato en organismos superiores podrían llegar a ser afectados eventualmente.

Bonilla y colaboradores (1998) investigaron el efecto de la toxicidad de una mezcla comercial de paraquat a corto plazo midiendo la incorporación de ^{14}C como expresión de la fotosíntesis en tres comunidades microalgales marinas (fitoplancton, perifiton y epipsamon). El fitoplancton y el perifiton resultaron ser más sensibles al herbicida (EC_{50} 9-23 μM) que el epipsamon y la disponibilidad del compuesto no se alteró por el sedimento en este último. Tales resultados son similares a los reportados con especies por separado, aunque los efectos pueden variar por los componentes del grupo y las características del medio.

Leboulanger y colaboradores (2011) evaluaron el efecto en comunidades planctónicas de aguas de reservas tropicales de tres pesticidas incluyendo al paraquat a concentraciones de 10 y 40.5 $\mu\text{g}/\text{l}^{-1}$ durante cinco días. El compuesto exhibió un efecto inhibitorio en todos los componentes de la comunidad planctónica (bacterioplancton, fitoplancton y zooplancton) con especial efecto en el fitoplancton reduciendo su crecimiento, la concentración de pigmentos fotosintéticos y la diversidad taxonómica además de un ligero efecto en las demás comunidades.

Su presencia puede alterar significativamente la tasa de fijación de nitrógeno en suelo hasta un 75% a concentraciones menores de 0.1 ppm por el daño que causa en *Azolla sp.* y *Anabaena sp.* pero aun sin efectos importantes en el crecimiento o el contenido de pigmentos de estos organismos (Holst *et al.*, 1982). Igualmente Rolston y colaboradores (1975) encontraron que en trébol blanco concentraciones de 280 g/ha de i. a. reduce la fijación de nitrógeno en 70% además de reducir el peso seco hasta en un 30%.

2.2. Efecto del paraquat sobre *Chlorella vulgaris*

Saenz y colaboradores (1997) estudiaron el efecto de un herbicida comercial con paraquat sobre cuatro clorofitas incluyendo a *C. vulgaris*, reportando que el efecto es característico para cada especie con diferentes intervalos de resistencia. El crecimiento de *C. vulgaris* a 48hr de exposición se inhibió con 0.1 $\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$ o concentraciones superiores de manera dependiente de la dosis, siendo de las especies más sensibles en el experimento.

Qian y colaboradores (2009) estudiaron el efecto inhibitorio de paraquat en la fotosíntesis, estrés oxidante y transcripción de genes en *C. vulgaris* a corto plazo. Estos autores reportan que a 24h del tratamiento hay reducción del crecimiento y el contenido de clorofilas, aumento en los niveles de EROs pese al aumento de la expresión de enzimas antioxidantes superóxido dismutasa (SOD), peróxido dismutasa (POD) y catalasa (CAT), acompañado del aumento en los niveles de

malondialdehído como reflejo de la peroxidación lipídica de las membranas respecto al control a concentraciones mayores a 0.5 μM . Atribuyen estos resultados a la disminución de la abundancia en la transcripción de genes relacionados con la fotosíntesis (*psaB*, *psbA*, *rbcL*) afectando los complejos PSI y PSII y el proceso de fijación de carbono a causa del compuesto. Concluyeron que *C. vulgaris* resultó especialmente sensible respecto a otras especies en las que el herbicida fuera igualmente analizado.

Baltazar y colaboradores (2014) estudiaron la posibilidad de disminuir la toxicidad de una presentación comercial de paraquat (Gramoxone de Syngenta) con lisina acetilsalicilato utilizando como modelo a *C. vulgaris*. Encontraron que concentraciones mayores a 40 $\mu\text{g/l}^{-1}$ disminuyen la tasa de crecimiento después de 48h con una inhibición dependiente de la dosis y que el lisina acetilsalicilato es capaz de contrarrestar significativamente los efectos del herbicida a una proporción de 1:8 de paraquat: lisina acetilsalicilato sin embargo estos resultados podrían cambiar debido a que numerosas investigaciones llevadas a cabo en diferentes especies muestran una amplia variedad de sensibilidad. El efecto protector de lisina acetilsalicilato fue atribuido a la rápida hidrólisis a ácido salicílico en el medio acuoso, el cual se sabe que funciona como una molécula de señalización natural en plantas para la activación de genes relacionados a defensa en respuesta a patógenos o factores de estrés, pero que en este caso pudo además relacionarse con la interferencia en la asimilación de paraquat y la neutralización directa de especies reactivas.

2.3. Comparación entre ingrediente activo y mezclas comerciales

Wilkinson y Lucas (1969) determinaron el efecto individual y conjunto de MV y Lipossal NX, un surfactante no iónico condensado de óxido nonil-fenol, que es de los principales aditivos en las formulaciones de paraquat (Gramoxone). El efecto se probó en *Fusarium culmorum* y *Trichoderma viride* encontrando que el i. a. resulta menos inhibitorio que el surfactante en la prueba individual, pero la unión de ambos resulta en una inhibición superior a la suma obtenida de cada compuesto por separado.

Benijts-Claus y Persoone (1975) analizaron la influencia de la formulación del herbicida paraquat en organismos acuáticos en cortos periodos de tiempo utilizando los surfactantes lipossal NX y Ethomene S25 (0, 25, 50 y 75%) en diferentes combinaciones con MV(0.1-0.4 ppm) sobre el alga *Scenedesmus opolensis* como representante de los productores primarios.

Encontraron que cuando se prueban por separado, ambos detergentes son menos tóxicos que el herbicida, siendo Ethomene S25 más tóxico por sí solo que lipossal NX, pero este último incrementa la toxicidad de MV en mayor medida. La adición del surfactante siempre será dependiente de la concentración del i. a., pero aun así, a bajas concentraciones de herbicida la toxicidad de los detergentes es dominante y viceversa. La combinación de 0.4 ppm de MV con 75% de surfactante, mayormente lipossal, resultó ser la más tóxica en el estudio.

Smith y Foy (1967) estudiaron la interacción de varias mezclas de paraquat con surfactantes aniónicos, catiónicos y no-iónicos. Reportan que aunque la variación en combinaciones de surfactante-herbicida modifica la tensión superficial y el pH esto no tiene un efecto significativo

con la actividad herbicida al ser aplicado en maíz. Igualmente la mayoría de los surfactantes utilizados mejoraron la toxicidad de paraquat, pero existieron particulares interacciones entre algunos surfactantes iónicos con paraquat que pueden limitar la efectividad. Finalmente resolvieron que para determinar la efectividad de una mezcla surfactante-paraquat hay variables a consideración como la especie utilizada, la concentración y naturaleza química de los surfactantes, las variables ambientales y la concentración aplicada.

Gerzerino y colaboradores (2009) analizaron el comportamiento combinado y en solitario de dos concentraciones de diquat (44.4 y 222.2 $\mu\text{g/l}^{-1}$) y del surfactante Agral® 90 (100 y 500 $\mu\text{g/l}^{-1}$) en micro ambientes con el helecho acuático *Lemna minor* (lenteja de agua) monitoreados una vez a la semana por un mes. En separado diquat inhibió fuertemente el crecimiento de las frondas a diferencia de la nula actividad de Agral en el rubro, sin embargo la presencia del aditivo solo redujo ligeramente el efecto de diquat en su menor concentración utilizada posiblemente por la dispersión del herbicida en la superficie acuosa. Se concluyó que en este caso no hubo daño representativo en plantas acuáticas por parte de la mezcla utilizada para la erradicación de plantas terrestres.

2.4. Caracterización del efecto de paraquat sobre la fotosíntesis

El análisis de la fluorescencia de la clorofila *a* es una herramienta útil y confiable para el análisis de diferentes contaminantes como metales pesados y herbicidas sobre el rendimiento de plantas y algas. Esta técnica provee determinaciones no invasivas de los cambios en el proceso fotosintético previo a la aparición de daños visibles en los organismos, evidenciando el efecto de contaminantes incluso en concentraciones mínimas (Kumar *et al.*, 2014).

Rodríguez y colaboradores (2012) determinaron el efecto del estrés por una formulación sobre el funcionamiento del cloroplasto en chícharo por citometría de flujo y complementariamente con fluorescencia modulada (PAM). Tras 12h de exposición al paraquat al 1% por aspersión sobre las hojas de la planta, hubo una reducción del rendimiento cuántico para la fotoquímica primaria (F_V/F_M) a través del tiempo, con la máxima reducción a las 24h pero sin daños aparentes al contenido de pigmentos fotosintéticos.

Dayan & Zaccaro (2012) utilizan la fluorescencia de la clorofila *a* para comparar mecanismos de acción herbicidas usando cotiledones de pepino sumergidos en soluciones a una concentración 100 μM de diferentes compuestos incluyendo una fórmula comercial de paraquat (Cekuquat). Las muestras fueron incubadas por 18h previo a la exposición a la luz (100 $\mu\text{moles}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$) para posteriormente medir los valores del rendimiento cuántico fotosintético y el transporte electrónico en la cadena (ETR por sus siglas en inglés) encontrando que MV no provocó la inducción de fluorescencia en el periodo de incubación en oscuridad (3-18h), pero tras un corto periodo de exposición a la luz se disminuyeron los valores de ETR y del rendimiento cuántico fotosintético.

Gou y colaboradores (2007) investigaron el efecto del i. a. sobre cultivares de arroz susceptibles y resistentes a bajas temperaturas con aspersiones del compuesto en una solución 0.01mM.

Reportan que el cultivar susceptible a enfriamiento fue más sensible a la toxicidad del herbicida reduciendo el rendimiento cuántico máximo para la fotoquímica primaria (F_V/F_M) hasta un 64.1% en las primeras 24 horas e inhibiendo completamente toda señal tras 72h. Por su parte el cultivar resistente no presentó alteraciones significativas en los parámetros analizados con la aplicación del herbicida presuntamente por la actividad antioxidante desarrollada por las condiciones de tolerancia al frío del cultivar.

Frankart y colaboradores (2003) evaluaron cuatro herbicidas utilizando la emisión de fluorescencia de la clorofila *a* de la lenteja de agua *L. minor*, incluyendo una formulación comercial de paraquat. Tras dos días de exposición a $1\mu\text{g/l}^{-1}$ hubo un aumento significativo de la disipación no fotoquímica (Non-Photochemical Quenching). A $10\mu\text{g/l}^{-1}$ el crecimiento de *L. minor* se redujo en un 13% acompañado de una disminución del rendimiento cuántico para la fotoquímica primaria en la oscuridad (F_V/F_M), el rendimiento cuántico operacional (Φ_{PSII}), el rendimiento cuántico de los centros de reacción abiertos (F_V'/F_M') y el aumento de la disipación de la energía por rutas no fotoquímicas (NPQ).

Ekmekci y Terzioglu (2005) estudiaron el efecto del i.a. sobre plántulas de cultivares y especies silvestres de trigo a concentraciones de 0, 15, 30 y 60 μM , obteniendo que la foto oxidación causada por paraquat afecta mayormente a las especies silvestres que a los cultivares, indicado por los resultados de emisión de fluorescencia. El herbicida afectó el rendimiento cuántico de los centros abiertos del PSII adaptado a luz y oscuridad, la eficiencia del atrapamiento de excitación en el PSII y el transporte electrónico aparente (ETR) además de la reducción de las concentraciones de clorofilas y aumento de la filtración membranal evidenciando la pérdida de la integridad y estabilidad llevando a la fuga de iones y solutos de la célula.

Kotabova y colaboradores (2008) estudiaron el efecto del ingrediente activo en hojas de cebada bajo luz limitante y su relación con la formación de zeaxantina y el decaimiento no fotoquímico (NPQ). Encontraron que a una concentración $10\mu\text{M}$ no acelera el transporte electrónico lineal en las membranas de los tilacoides y genera un ligero estrés oxidante. Sin embargo provoca el aumento en los niveles de zeaxantina que a su vez no se relacionaron con el aumento del NPQ lo que puede deberse a que en condiciones de luz limitante ($100\mu\text{moles}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$) el herbicida es capaz de activar la de-epoxidación de la violaxantina a zeaxantina, pero no promueve como tal la formación de centros disipadores, explicando el aumento en NPQ.

Eullafroy y colaboradores (2009) investigaron el efecto en la curva de inducción de fluorescencia con la prueba OJIP en *L. minor* expuesta a cuatro herbicidas incluido el paraquat como i. a. Reportan que paraquat afecta el rendimiento general de la cadena fotosintética expresada por la reducción en la fotoquímica primaria (Φ_{PO}) y el transporte electrónico más allá del primer aceptor quinona A (Ψ_{O}), disminuyendo directamente el rendimiento cuántico máximo para el transporte de electrones en el PSII (Φ_{EO}). Estas afecciones fueron consecuencia del daño provocado en los centros de reacción expresado por la disminución de la fluorescencia máxima (F_M) y la fluorescencia inicial (F_0), pero tal disminución de los centros fue moderadamente compensada por el aumento en el flujo energético a los centros aun funcionales (absorción por centro de reacción, ABS/RC)

aumento el nivel de la disipación térmica del exceso de energía (ΦDo). En el análisis de la fase rápida de la cinética de fluorescencia OJIP, reportan que paraquat tiene particular acción al nivel J y en el paso de I-P reflejando una obstrucción del paso electrónico entre quinona A (Q_A) y quinona B (Q_B) formando un cuello de botella a ese nivel aumentando la fluorescencia y en el transporte en el PSI reflejado por la reducción del nivel I-P. Estos daños son derivados del secuestro de electrones por el modo de acción del paraquat y la formación de radicales libres, ya que en el cloroplasto la alta concentración de oxígeno permite la rápida re-oxidación del paraquat afectando el transporte en la membrana de los tilacoides.

3. Justificación

En la agricultura el empleo del herbicida paraquat para el control de malezas ha provocado daños al ambiente y organismos no objetivo, y pese a que numerosas investigaciones con distintos organismos de prueba se han realizado sólo algunos han evaluado al compuesto puro respecto un producto comercial. Por esta razón en el presente trabajo se busca diferenciar el efecto que puede tener el ingrediente activo (metil viológeno) contra una mezcla comercial (paraquat) con el fin de identificar el efecto de cada uno sobre la microalga *Chlorella vulgaris*, la cual es un organismo de prueba estándar que se encuentra comúnmente en múltiples ecosistemas.

4. Objetivos

Objetivo general

Evaluar la actividad fotosintética de *Chlorella vulgaris* creciendo en presencia del herbicida paraquat como ingrediente activo y como fórmula comercial (Dragocson).

Objetivos particulares

-Determinar el efecto del paraquat sobre el crecimiento en biomasa y la concentración de pigmentos fotosintéticos de *Chlorella vulgaris* al ser cultivada en presencia de paraquat

-Examinar la eficiencia fotosintética por liberación de oxígeno de *Chlorella vulgaris* tras ser expuesta a paraquat

-Estimar la actividad fotosintética de *Chlorella vulgaris* por emisión de fluorescencia de la clorofila *a* tras ser expuesta a paraquat.

5. Materiales y métodos

5.1. Organismo

Se utilizó *Chlorella vulgaris* Beyerinck [Beijerinck] (Filum Chlorophyta, Clase Trebouxiophyceae, Orden chlorellales, Familia Chlorellaceae) donada por el laboratorio de Biotecnología de Microalgas del departamento de Biotecnología y Bioingeniería del Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del IPN, Ticoman.

5.2. Medio de cultivo

El mantenimiento de los organismos (cultivos semilla) y los tratamientos experimentales fueron cultivados en medio de cultivo "Perales-Cañizares-González" (PCG) libre de EDTA, pH 6.4 (Perales-Vela *et al.*, 2007) (apéndice). Las células se mantuvieron en un régimen de cultivo en lote con las siguientes condiciones de crecimiento: Temperatura 20-25°C, iluminación 200 $\mu\text{moles}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$, fotoperiodo 14/10 luz/oscuridad, y flujo de aire 200 $\text{ml}\cdot\text{m}^{-1}$. Como unidades experimentales de cultivo se utilizaron 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 inoculos sincronizados en la mitad de la fase exponencial, aproximadamente células de 72 h de cultivo.

5.3. Protocolo experimental

El efecto del paraquat (dicloruro de 1,1'-dimetil 4,4'-dipiridilo) en el metabolismo de *C. vulgaris* se estudió de acuerdo a los lineamientos de la guía 201 de la Organización para la Cooperación y el Desarrollo Económico (OECD) para la prueba de sustancias químicas en algas y cianobacterias (OECD, 2004). Las unidades experimentales se inocularon con $4 \cdot 10^5$ células $\cdot\text{l}^{-1}$, aproximadamente 5 $\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$ de peso seco o 0.4 de absorbancia a 750 nm. Las células fueron expuestas a las concentraciones de ingrediente activo (MV) 0 (testigo), 0.5, 1.0, 1.5, 2.0 y 2.5 μM y de fórmula comercial (PQ) (Dragocson®) 0(testigo), 25, 50, 100, 150 y 200 nM. Estas concentraciones fueron elegidas debido a que la aplicación de concentraciones logarítmicas que recomienda la guía 201 eran demasiado altas o demasiado bajas para realizar la identificación del efecto de cada compuesto. Los cultivos se expusieron a los compuestos por 72 h para después determinar el peso seco, el contenido de pigmentos fotosintético, la actividad fotosintética y respiratoria por oximetría y la actividad fotosintética por métodos de emisión de fluorescencia.

5.4. Variables experimentales de respuesta

A. Crecimiento

El crecimiento se determinó por peso seco (PS) tomando alícuotas de 50 ml de cada muestra experimental (n=3) filtradas por vacío en membranas de nitrocelulosa de 5.0 μm de diámetro de poro (Millipore®) llevadas previamente 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, transcurrido este tiempo se obtuvo el PS de la biomasa utilizando una balanza analítica.

La tasa de crecimiento relativo (μ) se determinó según la fórmula: $\mu = (\ln X_2 - \ln X_1) / 72$. 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 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% (CE_{50})

B. Pigmentos fotosintéticos

El contenido específico de pigmentos fotosintéticos por biomasa seca se cuantificó tomando de 2 a 5 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 a la pastilla de cada tubo fue resuspendida con 2 ml de metanol al 100% y se mezcló vigorosamente con ayuda de un vortex por un minuto. La mezcla metanólica se incubó en baño maría por 10 minutos a 60°C y nuevamente 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 determinaron según las siguientes fórmulas reportadas por Wellburn (1994):

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

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

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

C. Actividad fotosintética por oximetría

Transcurrido el tiempo de exposición a PQ y MV de cada unidad experimental se tomaron tres alícuotas de 10 ml o su equivalente en densidad óptica. Las muestras se centrifugaron a 3,000 rpm por un minuto, el sobrenadante se eliminó y la pastilla fue resuspendida en 1ml de medio de cultivo. La tasa fotosintética medida como liberación de oxígeno y la respiratoria como consumo se realizó 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 obtuvo iluminando la muestra con luz actínica blanca (400-700nm) y un flujo fotónico de 400 $\mu\text{moles}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$. al apagar la luz, se registro la velocidad de consumo de oxígeno (respiración) por dos minutos para obtener la tasa fotosintética neta.

D. Actividad fotosintética por emisión de fluorescencia

I. Emisión polifásica de fluorescencia de la clorofila *a* en el PSII: OJIP

La emisión polifásica de la fluorescencia de la clorofila *a* en el fotosistema II en muestras acondicionadas a la oscuridad se midió 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=10) o el equivalente en densidad óptica del tratamiento menos denso y se incubaron en oscuridad de 15 a 20 min a temperatura ambiente (25°C) para después ser irradiadas con una luz roja saturante ($\lambda=660 \text{ nm}$, $3000 \mu\text{moles}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$). La emisión de fluorescencia se registró por un detector con filtro de corte para emisión a 685 nm, los valores de la fluorescencia mínima ($F_0 = 50 \mu\text{s}$), la fluorescencia máxima ($F_M = 200 \text{ ms}$) y la fluorescencia variable ($F_V = F_M - F_0$) fueron registrados automáticamente por el equipo. La interpretación de los datos se realizó con el programa Handy-PEA desarrollado por la misma Compañía (Hansatech, U.K.) 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.*, 2003).

Tabla 1. Parámetros cinéticos de la prueba de OJIP (Van Hereden *et al.*, 2003)

Parámetros Técnicos		
Fluorescencia 50 ms	F_o	
Fluorescencia máxima	F_M	
Fluorescencia variable	F_V	$= F_M - F_o$
Pendiente desde el origen de la fluorescencia	M_o	$= (F_{300\mu s} - F_o) / (F_M - F_o)$
Fluorescencia variable a 2 ms	V_j	$= (F_j - F_o) / (F_M - F_o)$
Flujos específicos expresados por centro de reacción (RC)		
Absorción por centro RC	ABS/RC	$= (M_o/V_j) / (1 - F_o/F_M)$
Atrapamiento al tiempo 0 por RC	TRo/RC	$= M_o/V_j = (ABS/RC) \Phi P_o$
Tranporte electornico al tiempo 0 por RC	ETo/RC	$= (TRo/RC) \psi_o$
Productos (o relaciones de flujo)		
Producto cuántico máximo de la fotoquímica primaria	ΦP_o	$= TRo/ABS = (F_M - F_o) / F_M$
Producto cuántico máximo para que un excitón atrapado mueva un electrón después de QA	ψ_o	$= ETo/TRo = 1 - V_j$
Producto cuántico máximo para el transporte de electrones en PSII	ΦE_o	$= \Phi P_o \cdot \psi_o$
Rendimientos cuánticos y eficiencias		
Flujo específico de transferencia de electrones de Q_B hasta el lado aceptor del PSI	$(TRo/RC) \cdot (1 - V_i)$	$= (M_o/V_j) \cdot (1 - F_o/F_M)$
Eficiencia con la que un electron de los trnasportadores de lectrones entre sistemas se muieve para reducir el lado acptor del PSI	δR_o	$= (1 - V_i) / (1 - V_j)$
Producto cuántico máximo para la reducción de los aceptores finales en PSI	ΦR_o	$= [1 - (F_o/F_M)] \psi E_o \cdot \delta R_o$
Índices vitales		
Índice de rendimiento	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. Actividad fotosintética por emisión de fluorescencia: Método de pulso de amplitud modulada (PAM)

La eficiencia cuántica para el transporte electrónico (Φ_{PSII}) y la disipación energética por rutas no fotoquímicas (NPQ) se determinó utilizando tapetes celulares, obtenidos filtrando 10 ml o el equivalente en densidad óptica de cada tratamiento en membranas de nitrocelulosa de 5 μm de poro. La emisión de fluorescencia se midió colocando los tapetes celulares en pinzas de hoja y ajuntándolas a la fibra óptica. La hidratación del tapete celular se mantuvo utilizando una porción de papel filtro saturado con agua destilada colocado debajo del filtro de nitrocelulosa.

El análisis de la disipación energética y el transporte electrónico se realizó por medio de la técnica de pulsos saturantes utilizando un equipo de fluorescencia FMS (FLuorescence Monitoring System, Hnsatech, U. K.). Los tapetes celulares fueron adaptados a la oscuridad durante 5 minutos. El registro comenzó con la inducción de fluorescencia utilizando pulsos de luz modulada ($0.1 \mu\text{mol de fotones m}^{-2} \text{s}^{-1}$) para obtener el valor de fluorescencia mínima (F_0); posteriormente se aplicó un pulso de luz saturante ($10,000 \mu\text{mol/ m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$) para obtener el valor de fluorescencia máxima (F_M) y a continuación se encendió la luz actínica ($260 \mu\text{mol/ m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$). Transcurridos 240 segundos se registró el valor de fluorescencia como F_s , y se aplicó un nuevo pulso de luz saturante para obtener el valor de fluorescencia máxima a la luz (F_M'), enseguida se apagó la luz actínica y se aplicó luz infrarroja, para registrar el valor de fluorescencia mínima (F_0') bajo una condición lumínica (Figura 6)

Utilizando los valores obtenidos del gráfico se calculó el rendimiento cuántico operacional del PSII (Φ_{PSII}) y la Tasa de transporte electrónico relativo aparente (ETR) según las siguientes fórmulas reportadas por Maxwell y Johnson (2000): $\Phi_{PSII} = F_M - F_s / F_M'$; $\text{ETR} = \Phi_{PSII} * \text{PAR}$.

El decaimiento no fotoquímico (NPQ) se calculó según la fórmula reportada por Maxwell y Johnson (2000): $\text{NPQ} = F_M - F_M' / F_M'$.

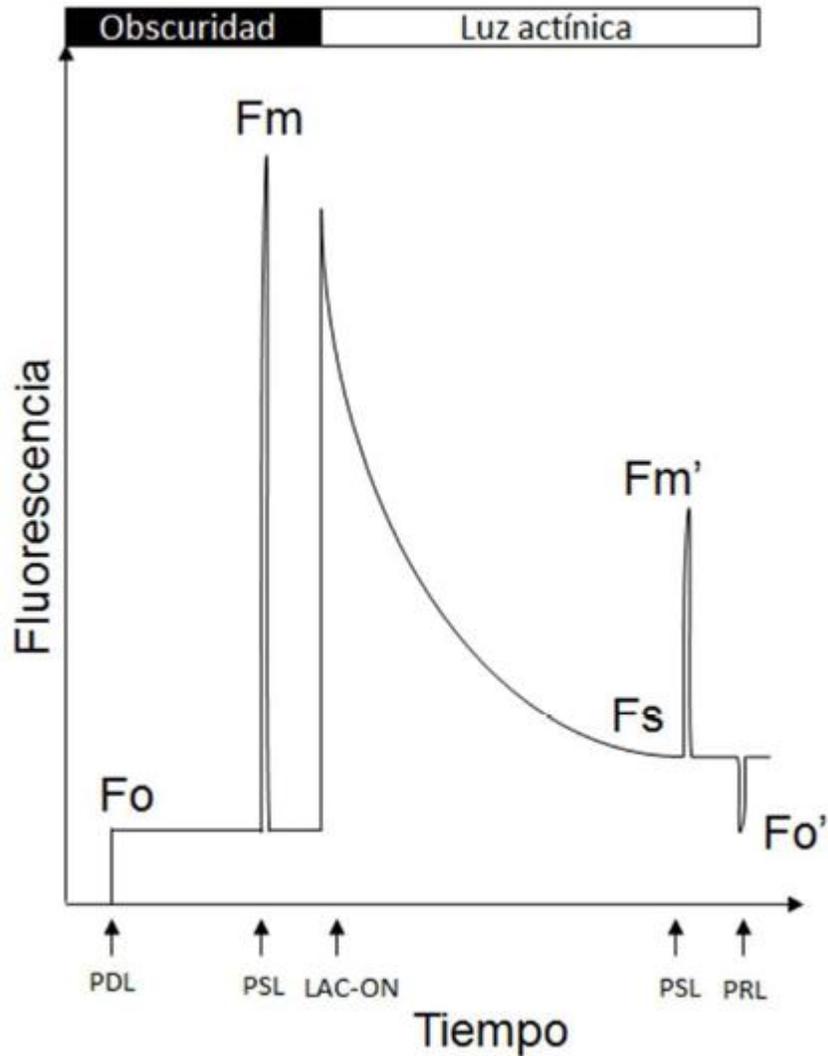


Figura 6. Representación esquemática del protocolo de Genty (1989) de fluorescencia modulada, para la obtención de qP y NPQ. PDL= pulso débil de luz, PSL= pulso saturante de luz, LAC-ON= luz actínica constante encendida, LAC-OFF= luz actínica constante apagada, PRL= pulso de luz rojo lejano.

5.5. Análisis estadístico

Los resultados son expresados como el promedio de las mediciones realizadas. Se aplicó un análisis de varianza (ANOVA) para un diseño experimental de bloques al azar generalizados (DEBAG) así como la prueba de Tukey, que se realizaron con el paquete estadístico SAS®.

6. Resultados y discusión

A. Crecimiento

Ambos compuestos alteran el crecimiento y las funciones metabólicas de *C. vulgaris*, sin embargo la medida en que lo hacen presentan diferencias entre sí. Los resultados de peso seco (Figura 7) muestran que MV y PQ afectan significativamente ($p < 0.05$) el crecimiento de *C. vulgaris*, inhibiéndose hasta en 65.55% y 63.08% con MV y PQ respectivamente con las máximas concentraciones utilizadas (MV=2.5 μM , PQ=200 nM). La concentración efectiva media para inhibir el 50% del crecimiento (CE_{50}) calculada para MV fue de 1.46 μM , y de 78.19 nM con PQ siendo 20 veces más tóxico éste último en relación a la cantidad de i.a. en el medio.

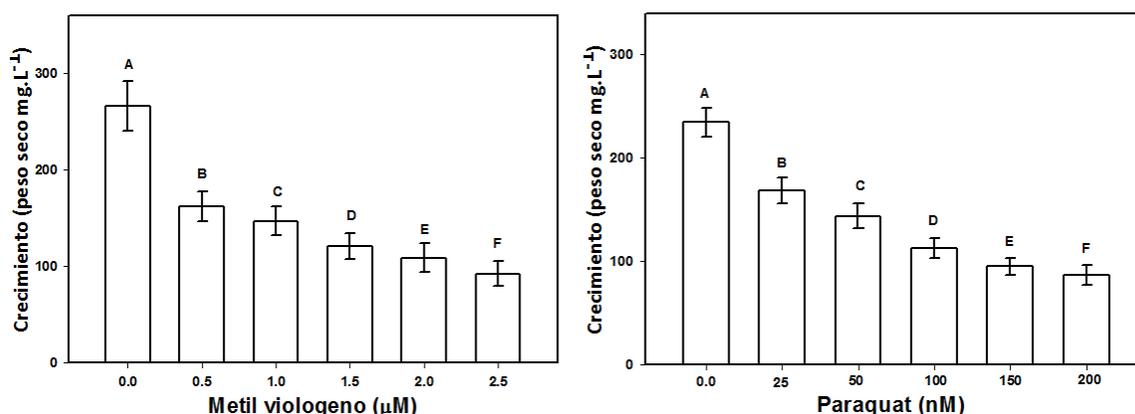


Figura 7. Efecto de las concentraciones de MV y PQ en el crecimiento de *C. vulgaris* expresado en peso seco posterior a 72 h de exposición. (Las letras indican diferencias significativas según la prueba de Tukey $p < 0.05$)

El efecto de MV es similar al encontrado por Qian y colaboradores (2009) donde a partir de 0.5 μM se inhibe el crecimiento de *C. vulgaris*. Reporta que el efecto de MV reduce el contenido de clorofila *a*, clorofila *b* y clorofila total, y fomenta la actividad de enzimas antioxidantes (SOD, peróxido dismutasa POD y catalasa CAT) que aun así son superadas por la generación de EROs por el herbicida. La evaluación de genes relacionados con la fotosíntesis arrojó que esta concentración disminuyó la abundancia de la transcripción de los genes *psaB* y *rbcL*. La inhibición del gen *psaB* disminuye la actividad en el PSI debido a que codifica para la proteína del centro de reacción de dicho fotosistema, afectando la cantidad de enzima correspondiente y su actividad, previniendo el transporte electrónico normal en el PSI. La disminución en la abundancia de la transcripción del gen *rbcL* mostro que MV inhibe la fijación de carbono al disminuir la síntesis de la ribulosa 1,5-bifosfato carboxilasa (la subunidad grande de la RuBisCO), que a pesar de que no influir en la actividad enzimática logró afectar el crecimiento y la división celular.

Zhang y colaboradores (2014) concuerdan en la inhibición del gen *rbcL* y el aumento de la actividad de enzimas antioxidantes tras la aplicación de MV en *Chlorella pyrenoidosa* con dosis entre 0.6 a 3.4 μM . Sumándose a ésta, se inhiben los genes *psbA* y *chl/L* que codifican para la proteína integral de membrana en el PSII (proteína D1) y para la subunidad L de la protoclorofilida reductasa independiente de luz respectivamente. Además encuentra que las condiciones de mixotrofia pueden tener mayor impacto en la toxicidad y los efectos de MV comparado con

autotrofia, lo que puede ser un factor importante en trabajos experimentales y el comportamiento que tiene MV en el medio. En contraste, Ma y colaboradores (2002) reportan que una concentración $1 \cdot 10^{-4} \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$ de i. a. en una fórmula de PQ al 20% comienzan a inhibir a *C. pyrenoidosa*, corroborando que menores concentraciones tengan el mismo efecto sobre la transcripción de genes usando un herbicida comercial.

Jamers y de Coen (2010) encuentran alteraciones en la transcripción de genes envueltos en la progresión del ciclo celular, formación del citoesqueleto y varios componentes de los acarreadores fotosintéticos dentro 72 hr de aplicación de MV a concentraciones entre 0.1 y 0.4 μM en *Chlamydomonas reinhardtii*. Soportan la teoría de que esta inhibición en la transcripción es consecuencia de la falta de sustratos para las enzimas antioxidantes.

En el ciclo ascorbato-glutatin tras la oxidación del GSH (glutatin) y ASC (ascorbato) por las EROs, las enzimas reductasa necesitan NADPH como equivalente reductor, el cual no es generado por efecto del herbicida. Recíprocamente los productos oxidados previenen el funcionamiento de enzimas como la glutatin-S transferasa y APX (ascorbato peroxidasa), entre otras, las reacciones y los ciclos implicados se aprecian con mejor detalle en la figura 8.

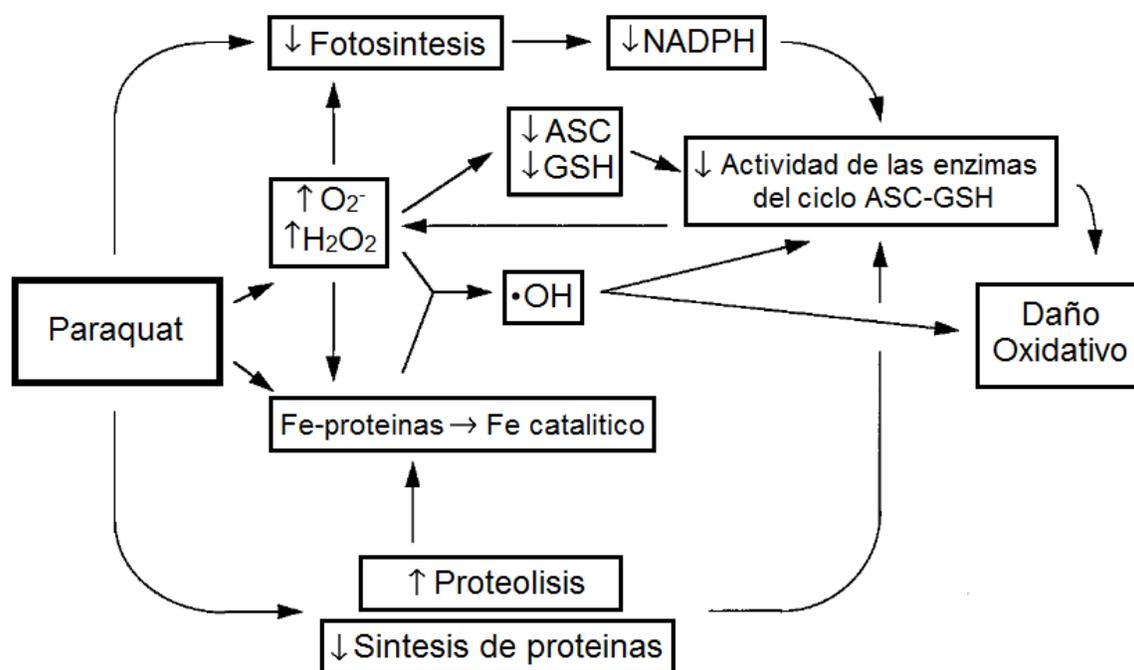


Figura 8. Ciclo de toxicidad por estrés oxidante derivado de las reacciones de paraquat, tomado de Iturbe.Ormaetxe *et al.*, 1998

En respuesta al estrés la inducción de un gen homólogo a una proteína cinasa activada por mitógeno (MAPK por sus siglas en inglés) es posiblemente la que inicia la inhibición de la transcripción al menos en los genes envueltos en la progresión del ciclo celular y formación de citoesqueleto, afectando el crecimiento y la formación de nuevos organismos.

La velocidad de crecimiento (μ) de *C. vulgaris* disminuyó significativamente ($p < 0.05$) con el aumento de MV o PQ en el medio, con las mayores concentraciones probadas la tasa se redujo

35.95% y 34.39% con MV y PQ respectivamente (Figura 9). De manera similar el tiempo de duplicación se extendió significativamente ($p < 0.05$) de 15.17 y 15.63 horas hasta 27.86 y 25.28 horas para MV y PQ respectivamente, encontrando que MV retrasó el tiempo de duplicación 2.75 h más que PQ (Figura 9). Sin embargo en términos de concentración del herbicida en el medio el efecto de PQ es múltiples veces más severo pudiendo adjudicar tal efecto a los aditivos presentes pues a grandes rasgos resultaron ser la única diferencia en el medio respecto a MV y tal toxicidad es producto tanto de la proporción respecto al paraquat o del compuesto surfactante añadido por si mismo.

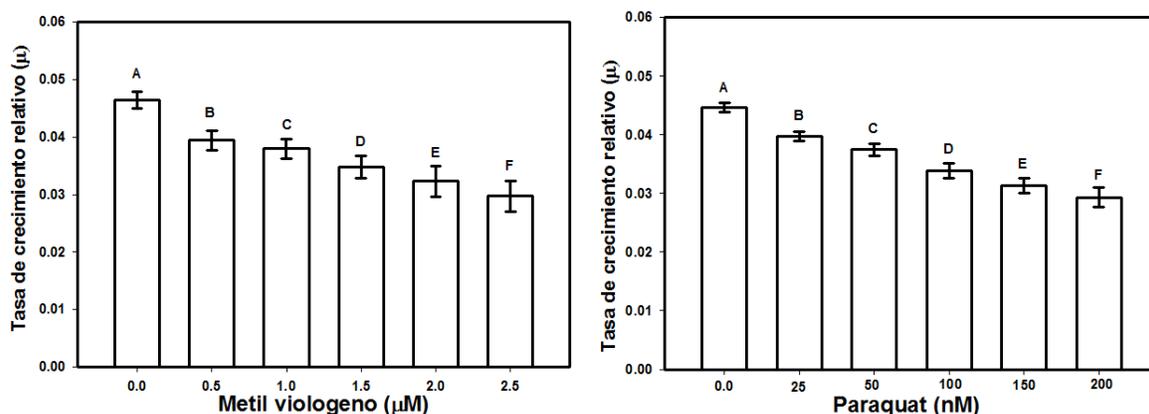


Figura 9. Efecto de las concentraciones de MV y PQ en la tasa de crecimiento relativo de *C. vulgaris* posterior a 72 h de exposición. (Las letras indican diferencias significativas según la prueba de Tukey $p < 0.05$)

Los resultados obtenidos con PQ en el presente estudio son similares a los reportados por Baltazar y colaboradores (2014) utilizando una fórmula distinta de nombre Gramoxone (nombre comercial de la mezcla fabricada por Syngenta), donde $40 \mu\text{g}/\text{l}^{-1}$ equivalente a $0.15 \mu\text{M}$ o 150 nM (de i. a.) son necesarios para reducir la tasa de crecimiento de *C. vulgaris* tras 48 h de exposición, pero sin efecto con $20 \mu\text{g}/\text{l}^{-1}$ (75 nM). Por otro lado, Saenz y colaboradores (1997) reportan que la inhibición en el mismo organismo se logra con una concentración nominal de $0.1 \text{ mg}/\text{l}^{-1}$ (equivalente a 388.8 nM) o superior de la fórmula Osaquat (compañía OSA, Argentina 27.6% de i. a.) tras 48 h de exposición y a $0.05 \text{ mg}/\text{l}^{-1}$ (194.4 nM) o superior tras 96 h de exposición.

Las concentraciones de PQ usadas en esta investigación resultaron más dañinas que el Gramoxone utilizado por Baltazar (2014), sugiriendo que la toxicidad es variada e impredecible según el producto utilizado. Las presentaciones de Gramoxone con 20% de i. a. contiene 5% o 10% de dos detergentes, lissapol NX (detergente no iónico) y DS4392/Ethomene S25 (detergente catiónico), sin embargo la proporción exacta de cada uno es un secreto industrial.

En *Scenedesmus opoliensis* (*Desmodesmus opoliensis*, chlorophyta) la proporción de i.a. y surfactantes limita el crecimiento de modo distinto. Aunque la toxicidad del i.a. es dominante dentro de la fórmula, la concentración de cada surfactante puede modificar la toxicidad. Una proporción 1:9 de ethomene/lissapol genera la mayor inhibición con MV comparado con concentraciones 1:1 y 9:1, demostrando que la presencia de lissapol es determinante en la toxicidad a pesar de ser hasta 20 veces menos tóxico que ethomene. No obstante, cuando MV

esta en bajas concentraciones en la fórmula, la toxicidad de los surfactantes es dominante y viceversa (Benijts-Claus & Persoone, 1975).

Al estar fuera de patente, una fórmula de PQ puede ser producida por diferentes compañías con otros compuestos a los establecidos; como ejemplo el surfactante lubrol L comúnmente usado junto lissapol puede restringir la asimilación del MV en hojas de coliflor principalmente por la estructura del surfactante (Bland & Brian, 1972). Si bien el efecto no es similar dentro de las células, la alta solubilidad en agua de lubrol puede afectar las membranas en una microalga variando la medida en que afectan i.a. y aditivos en un producto aleatorio como el dragocson.

Por su parte Rodea-Palomares y colaboradores (2015) encuentran que la pre-exposición a compuestos perfluorinados modifica drásticamente la sensibilidad a MV ($0-0.5 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$) utilizando una cepa de *Anabaena sp.* El ácido perfluorooctanoico y sulfonato perfluorooctano son ampliamente utilizados en la industria y su presencia modifica la integridad y el potencial de membrana al ser analizados por etiquetado fluorescente acoplado a citometría de flujo; éstos compuestos duplican el efecto de MV con cantidades menores de la concentración de efectos no observados ($5\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$).

Para el caso de Sáenz y colaboradores (1997), quienes reportan que el daño en *C. vulgaris* se logra hasta las 48 hr de exposición a una concentración de $0.1 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$ de Osaquat (mezcla comercializada por OSA en Argentina) equivalente a 388.8 nM de i. a., es posible que las condiciones de cultivo utilizando un sistema de agitación en lugar de burbujeo y una menor intensidad lumínica aplicada (aproximadamente $40-50 \mu\text{moles}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$) fueran factores determinantes en el grado de toxicidad provocado por el herbicida.

Fischer y colaboradores (2011) explican que el efecto de MV se modifica por el nivel de irradiación aplicada utilizando como modelo a *Chlamydomonas reinhardtii*. Una intensidad lumínica denominada baja y media ($120-400 \mu\text{moles}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ por 24 h) dentro de su experimento permite el crecimiento del alga con una CE_{50} de $0.26 \mu\text{M}$ haciendo a *C. reinhardtii* más sensible a MV que *C. vulgaris*. A mayor iluminación ($800-1600 \mu\text{moles}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$) el efecto de MV aumenta, reduciendo la CE_{50} ($0.21 \mu\text{M}$ y $0.10 \mu\text{M}$ respectivamente). La dependencia en el transporte de electrones fotosintético hace que una mayor iluminación incremente la reducción del MV y por ende la producción de EROs. A bajas irradiaciones, los sistemas antioxidantes aun pueden hacer frente a los efectos del herbicida, mientras que a mayor iluminación, los sistemas se ven superados dañando la actividad, composición celular y síntesis de pigmentos (Figura 10).

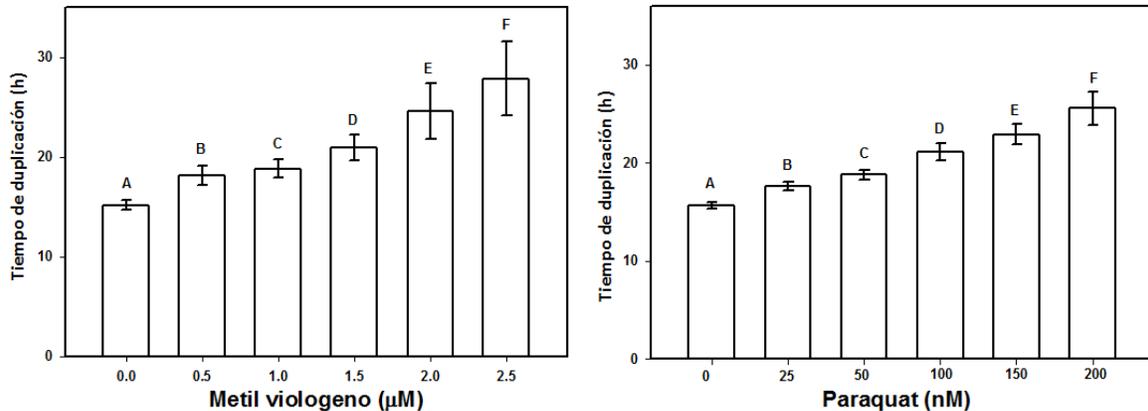


Figura 10. Efecto de las concentraciones de MV y PQ en el tiempo de duplicación de *C. vulgaris* posterior a 72 h de exposición (Las letras indican diferencias significativas según la prueba de Tukey $p < 0.05$)

El empleo de diferentes mezclas comerciales con paraquat han arrojado diversos resultados por varios autores al analizar el efecto de estos compuestos sobre el crecimiento de *Scenedesmus quadricauda*. Saenz y colaboradores (2001) reportan que utilizando el producto Osaquat sobre un cultivo no especificado obtenido del Río Lujan (Buenos Aires, Argentina), la reducción de la densidad celular, tasa de crecimiento y tiempo de duplicación son severamente afectados a una concentración de $0.4 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$ ($1.5 \text{ }\mu\text{M}$) o superior provocando la reducción del 90% del crecimiento poblacional respecto al control con $1.6 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$, y la total inhibición del crecimiento con $3.2 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$ ($12.4 \text{ }\mu\text{M}$).

Estos datos permitieron argumentar que bajo concentraciones de 0.4 y $0.8 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$ el efecto fue "alguistático" y con 1.2 y $1.6 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$ fue aparentemente alguicidas, sin embargo posteriormente al resembrar los cultivos experimentales en medio carente de herbicida, el crecimiento presentó un alargamiento de la fase lag o de aclimatación que se extendió en proporción al aumento de la concentración a la que se sometieron previamente. Este fenómeno pudo afectar al tiempo de duplicación celular provocando un retraso, pero logrando alcanzar un crecimiento similar al control hasta la tercera resiembra.

En el trabajo previo realizado por el mismo Saenz en 1997 usando dos diferentes cepas de *S. quadricauda* encuentra que una cepa estándar obtenida de la colección de cultivos de algas y protozoos de Inglaterra no fue inhibida con 0.1 , 0.2 ni $0.4 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$ de i. a., pero se logra una disminución significativa con 0.8 mg ($800 \text{ }\mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1} = 3.1 \text{ }\mu\text{M}$) utilizando la previamente citada fórmula Osaquat. Sin embargo el efecto causado sobre una cepa silvestre aislada del Río Lujan mantenida en condiciones de laboratorio por periodo de un año, la concentración necesaria para la inhibición del crecimiento desciende considerablemente hasta $0.1 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$ para afectar el crecimiento.

Si bien resulta interesante que el mismo Saenz en 1997 obtuviera resultados diferentes dentro de su mismo experimento y comparado con su reporte en 2001, hubo factores experimentales que pudieron alterar los resultados más allá de la especie utilizada y el ambiente al cual está acostumbrado un organismo dado, ya que hay una clara diferencia entre un organismo "estandarizado" de una colección de cultivos y un homólogo silvestre igualmente adecuado a un periodo de tiempo previo a su utilización en pruebas de compuestos tóxicos.

Por su parte, Ibrahim (1990) utilizando PQ Gramoxone (40% i. a., 10% surfactantes) reporta que a partir de $132 \mu\text{g}/\text{l}^{-1}$ ($0.51 \mu\text{M}$) se prolonga el tiempo de duplicación, el crecimiento como peso seco y el contenido de clorofilas, carotenoides, carbohidratos y proteínas, siendo estas concentraciones similares a las que se encontraron con MV en la presente investigación.

Wong (2000) utilizando una fórmula de PQ (Imperial Chemical Industries, Inglaterra; 20% i. a.) reduce la tasa de crecimiento a la mitad con una concentración de $0.02 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$ (70nM), y una concentración de $0.2 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$ ($0.7\mu\text{M}$) fue suficiente para inhibir la síntesis de pigmentos fotosintéticos y la liberación de oxígeno. Concentraciones mayores de $2 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$ ($7\mu\text{M}$) inhibieron totalmente el crecimiento del alga, indicando que los resultados reportados por Wong se asemejan a los obtenidos con PQ en esta investigación.

Estas diferencias pueden ser derivadas de factores experimentales que variaron entre los autores así como la iluminación, el método de agitación, la fuente de la cepa utilizada y fundamentalmente de la diversidad de mezclas comerciales de paraquat citadas. Sin embargo resalta el hecho de que en *S. quadricauda* la concentración necesaria para la inhibición del crecimiento y los procesos metabólicos abarca un espectro amplio que depende de otros factores además de la sensibilidad particular de una especie. Cabe resaltar que los autores coinciden en que las concentraciones utilizadas por cada uno se encuentran dentro de los límites de aplicación del herbicida para la erradicación de macrófitas o los límites máximos permisibles según cada autor.

B. Contenido de clorofilas y carotenoides totales

La concentración volumétrica de clorofilas y carotenoides totales disminuyó significativamente ($p < 0.05$) con la aplicación de ambos compuestos. La reducción en el contenido de clorofila total (a+b) fue de 81.10% y 85.91% con las máximas concentraciones utilizadas de MV y PQ respectivamente (Figura 11). En contraste, el contenido de clorofilas por peso seco se redujo solo en 57.56% y 58.28% con MV y PQ presentando menores diferencias significativas entre los tratamientos (Figura 13).

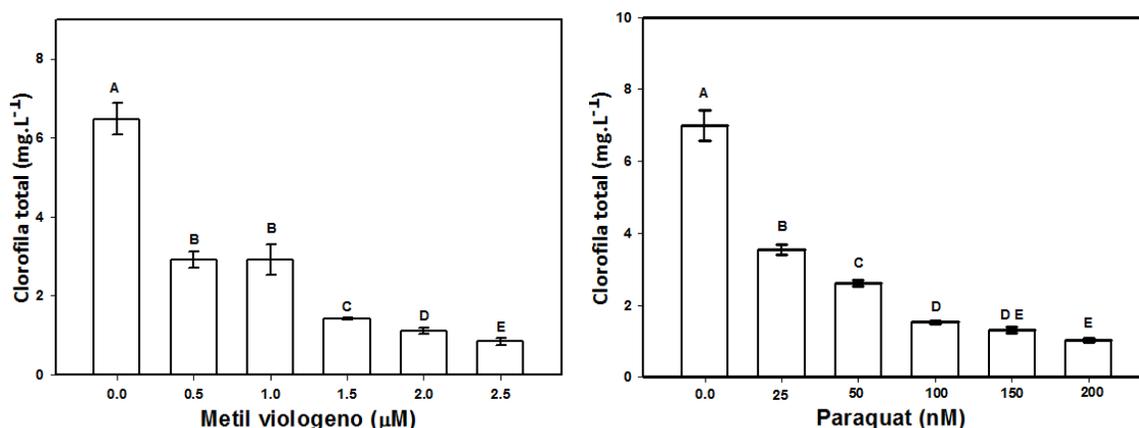


Figura 11. Efecto de las concentraciones de MV y PQ en la concentración de clorofila total de *C. vulgaris* posterior a 72 h de exposición (Las letras indican diferencias significativas según la prueba de Tukey $p < 0.05$)

La reducción en el contenido de clorofilas se relaciona comúnmente con la inhibición del crecimiento, donde varios trabajos reportan el efecto de paraquat en la concentración de pigmentos fotosintéticos en *C. vulgaris*, *S. quadricauda*, *C. reinhardtii* y *C. pyrenoidosa* (Ibrahim, 1990; Wong, 2000; Saenz *et al.*, 2001; Quian *et al.*, 2009; Fischer *et al.*, 2010; Zhang *et al.*, 2014). Zhang y colaboradores (2014) señalan que dicho fenómeno se puede relacionar con la reducción en la abundancia de la transcripción del gen chl/L que codifica para la subunidad L de la protoclorofilida reductasa independiente de la luz, relacionada con la reducción del doble enlace C17-C18 que forma clorofilida *a*, precursor directo de la clorofila *a*.

Por otra parte el efecto que causa MV dentro del cloroplasto altera el ciclo ascorbato glutatión (figura 12 b), la principal ruta antioxidante en el organelo. La disminución en la poza de NADP por la reducción en la actividad fotosintética provoca que el oxígeno sea preferencialmente reducido a superóxido y otras EROs siguiendo la ruta antes dicha (figura 12 a). Las células bajo el efecto de MV hacen frente aumentando los niveles de GSH, aun así la carencia de equivalentes para las enzimas reductasa no permite el correcto funcionamiento del ciclo. Como parte del proceso la acumulación del glutatión oxidado (GSSG) al alcanzar altas concentraciones actúa como un pro oxidante que se suma a la degradación de los componentes del cloroplasto y la célula (figura 12 c) (Kirtikara & Talbot, 1996).

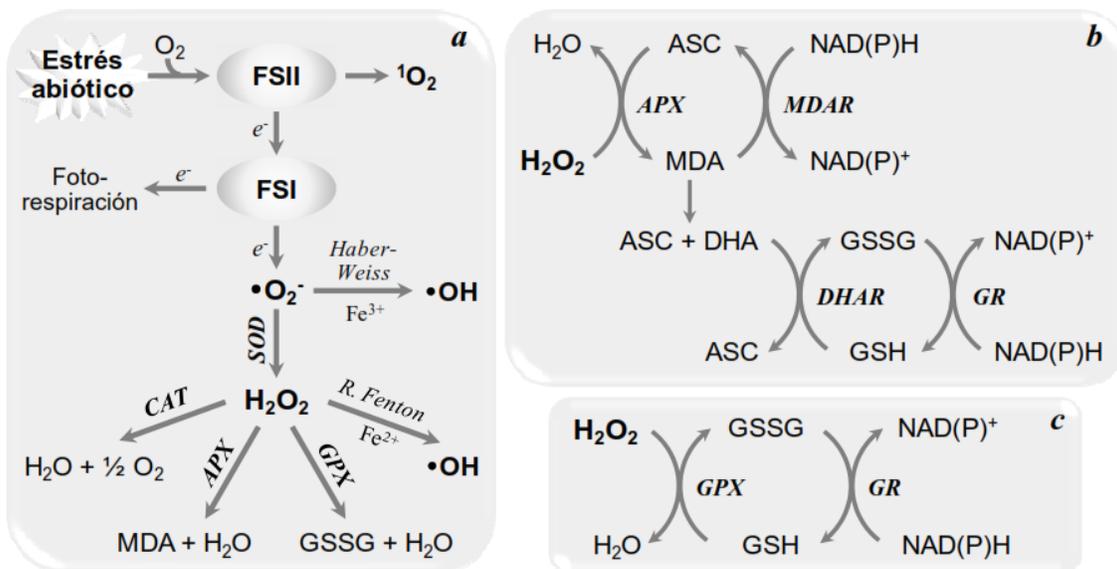


Figura 12. Mecanismo de generación y defensa de EROs generadas por estrés. El $\bullet O_2^-$ formado puede ser dismutado a H_2O_2 por la SOD o convertido en $\bullet OH$ por la reacción de Fenton(a). Igualmente H_2O_2 es eliminado por CAT, o por el ciclo ascorbato-glutatión (b) en presencia de agentes reductores (NADPH) o (c) por la acción de GPX dependiendo de la disponibilidad de los agentes reductores. GPX (glutatión peroxidasa), MDA: monodehidro-ascorbato; DHAR; dehidro-ascorbato; GSSG: glutatión disulfuro u oxidado; MDAR: MDA reductasa; DHAR: DHA reductasa; GR: glutatión reductasa; FS: fotosistema. (Peralta-perez y Volke-Sepulveda, 2012)

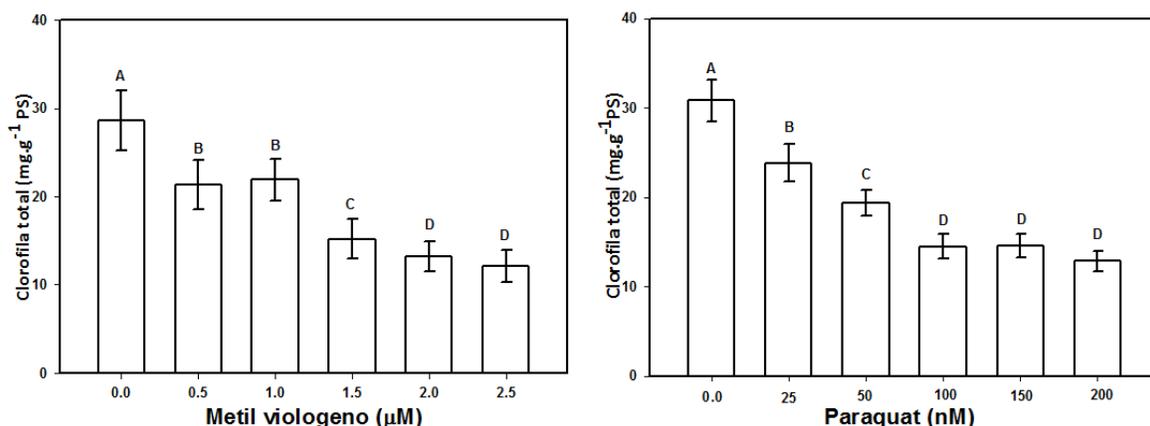


Figura 13. Efecto de las concentraciones de MV y PQ en la concentración de clorofilas por peso seco en *C. vulgaris* posterior a 72h de exposición (Las letras indican diferencias significativas según la prueba de Tukey $p < 0.05$).

Prado y colaboradores (2011) reportan que en *C. moewusii* la aplicación de 200 nM de MV provocó la reducción volumétrica del 90% de la clorofila *a* con mayor sensibilidad de ésta y de los carotenoides ($> [50nM]$) a partir de 100nM, comparativamente con el contenido de clorofila *b*. Esto provocó que el porcentaje de células cloróticas aumentara al 80% indicado por la reducción en la autofluorescencia, acompañado de alteraciones en el tamaño y complejidad celular por citometría de flujo. El tamaño de las células cloróticas fue menor al de las células no cloróticas cuyo tamaño aumenta respectivamente con la concentración de MV aplicado, lo que se traduce en daño a las membranas por peroxidación lipídica a causa de EROs en las células sobrevivientes.

Sin embargo el mismo Prado y colaboradores (2009) en un trabajo previo aplicando las mismas concentraciones (0.1, 0.15, 0.2 μM) por 48 hr, reportan la inhibición de la tasa de crecimiento pero

el aumento del peso seco, clorofila *a* (volumétrico) y proteínas respecto al control de manera dependiente de la dosis utilizando igualmente *C. moewusii*. Esto puede parecer contradictorio, pero al ajustar el contenido de clorofila *a* según el aumento del peso seco resulta en la reducción del pigmento por gramo de biomasa. En este caso explican que las diferencias pueden deberse al desacoplamiento del crecimiento celular y el proceso reproductivo por la alteración del estatus bioenergética general. Posiblemente modificaciones metabólicas similares (aumento o reducción del tamaño celular y en la reproducción) tuvieron un efecto parecido en la diferencias de las estimaciones volumétricas y en peso seco de los pigmentos fotosintéticos en la presente investigación.

Cabe señalar que aunque la inhibición del crecimiento y la concentración de pigmentos van de la mano, cantidades menores pueden llegar a afectar la concentración de lípidos de las membranas y el contenido de pigmentos fotosintéticos antes de ver efectos en los parámetros de crecimiento. En *Chlamydomonas eugametos*, una concentración de 0.15 μM afecta el crecimiento, la concentración de lípidos y pigmentos fotosintéticos, pero una concentración de 0.037 μM es suficiente para comenzar a alterar los lípidos y pigmentos. Estos últimos fueron afectados tras las primeras 24 hr de exposición a MV, pero las máximas diferencias se registraron a las 96h siendo las clorofilas especialmente sensibles al herbicida. Esto señala que otros indicadores del estado metabólico del alga se ven afectados antes de haber efectos observables sobre el crecimiento de un organismo y que dosis muy pequeñas del herbicida pueden comenzar a ser dañinas (Franqueira *et al.*, 1999)

El contenido volumétrico de carotenoides presente en las células disminuyó 81.05% y 78.14% con MV y PQ respectivamente (Figura 14). Nuevamente la concentración de carotenoides por peso seco presenta menor afección reduciéndose sólo en 46.41% y 37.02% con las mayores concentraciones utilizadas (Figura 15). Los resultados arrojan que PQ afecta mayormente la síntesis de clorofilas mientras que MV lo hace en el contenido de carotenoides, sin embargo con la aplicación de PQ hay una mayor brecha entre el contenido de clorofilas y carotenoides que la obtenida con MV.

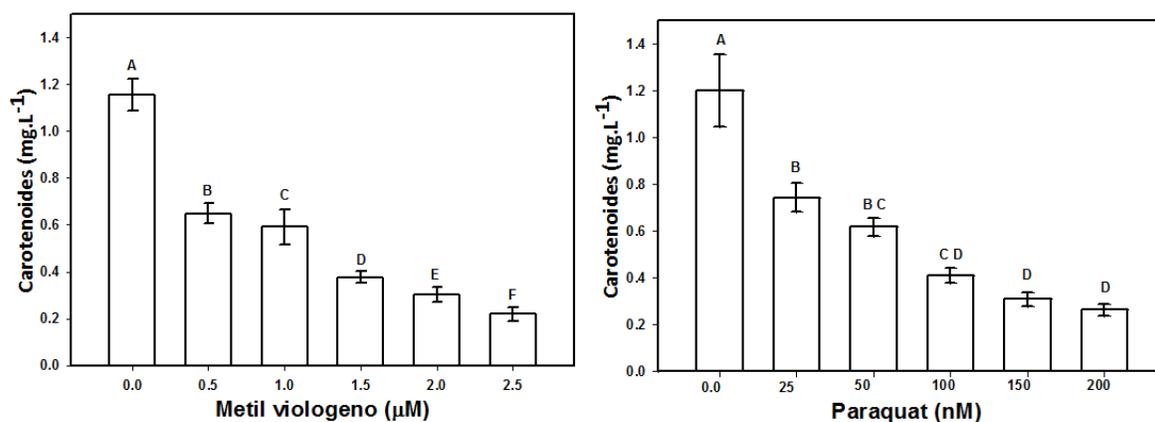


Figura 14. Efecto de las concentraciones de MV y PQ en la concentración de carotenoides totales de *C. vulgaris* posterior a 72 h de exposición (Las letras indican diferencias significativas según la prueba de Tukey $p < 0.05$).

Se ha visto que el efecto de PQ a bajas concentraciones (1-8 ng/l) estimula el crecimiento de *Dunaliella tetiolecta* debido al transporte de electrones, pero a mayor concentración la población comienza a disminuir por el severo daño oxidativo. Las altas concentraciones de carotenoides dentro de la célula le dan resistencia a daños por estrés lumínico y oxidante, sin embargo la síntesis de estos pigmentos depende de la integridad de las membranas, que al ser dañadas por el PQ y los surfactantes no permiten este y otros procesos en la célula llevándola a la muerte (Calderón-Rodríguez y Serpa-Ibañez, 2003).

Pérez y colaboradores (2012) reportan que la reducción en la síntesis de carotenoides se relaciona con autofagia como una medida de supervivencia en *Chlamydomonas reinhardtii* utilizando diferentes pesticidas. Un herbicida como norflurozan que inhibe directamente la síntesis del pigmento inicia el proceso de autofagia, pero un herbicida que inhibe el transporte electrónico fotosintético no dispara el proceso en sí. No obstante PQ promueve la autofagia bajo iluminación y moderadamente en la oscuridad por foto-oxidación y producción de EROs más que por la reducción de carotenoides o la inhibición de la fotosíntesis, además de participar también en la reducción del gen *rbcl* afectando el crecimiento de la población.

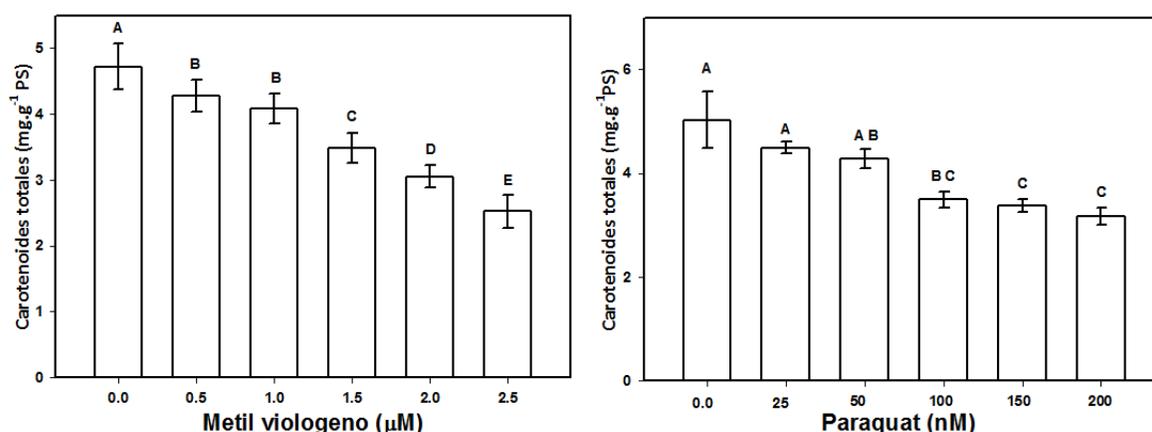


Figura 15. Efecto de las concentraciones de MV y PQ en la concentración de carotenoides por peso seco en *C. vulgaris* posterior a 72h de exposición (Las letras indican diferencias significativas según la prueba de Tukey $p < 0.05$).

En hojas de variedades cultivadas y silvestres de trigo altas concentraciones de MV (0, 15, 30 y 60 µM) provocan la reducción del contenido de clorofilas y carotenoides, siendo los organismos silvestres más susceptibles a la foto oxidación y lipoperoxidación por efecto del herbicida que las variantes cultivadas. Entre las diferencias metabólicas que le otorgaron al cultivar mayor resistencia a PQ destacan una mayor concentración de carotenoides y actividad de enzimas antioxidantes (APX, SOD, POD, GR y CAT) comparado con la variedad silvestre (Ekmecki y Tercioglu, 2005).

Los carotenoides protegen los centros de reacción del estrés lumínico por medio del ciclo de las xantofilas, por lo cual la reducción en el contenido de estos pigmentos no permite la formación de las moléculas implicadas zeaxantina, anteraxantina y violaxantina. La epoxidación de zeaxantina y de deepoxidación de la violaxantina están reguladas por los niveles de pH en el lumen del

tilacoide, donde MV tiene efecto acidificante por aumento del bombeo protónico debido a la estimulación del transporte electrónico lineal cuando alcanza mayores concentraciones. Esta acidificación del lumen se traduce en el aumento de la de-epoxidación de la violaxantina para ayudar a la formación de centros disipadores en el LHCII, lo que aumenta los niveles de disipación térmica o “quenching no fotoquímico” (NPQ) como se explica más adelante (Kotobova *et al.*, 2008).

C. Actividad fotosintética por liberación de oxígeno

La liberación de oxígeno fotosintético disminuyó con el aumento de la concentración de MV o PQ presentando diferencias significativas entre los tratamientos (Figura 16). Hubo una reducción del 74.45% y 71.91% utilizando MV y PQ respectivamente con las máximas concentraciones utilizadas, habiendo mayor diferencia y efecto de MV respecto al control.

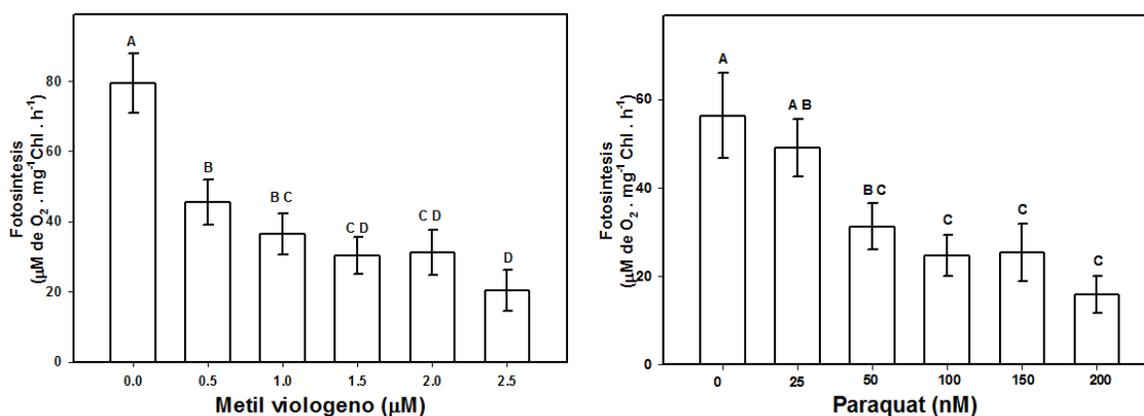


Figura 16. Efecto de las concentraciones de MV y PQ en la fotosíntesis medida por liberación de O₂ en *C. vulgaris* tras 72 h de exposición (Las letras indican diferencias significativas según la prueba de Tukey p<0.05).

Se ha visto que concentraciones tan bajas como 0.02 µM (20 nM) de PQ generan una disminución en la liberación de oxígeno fotosintético En *S. quadricauda* Berb 614a alcanzando una inhibición de hasta el 60% con 0.2 µM (200nM) siendo especialmente dañino en este y otros parámetros comparado con los pesticidas glifosato y 2-4 D (Wong, 2000).

La respiración en el hongo *Fusarium culmorum* medida por consumo de oxígeno es rápidamente suprimida con la aplicación de gramoxone humectable a concentraciones de 200 y 400 mg·L⁻¹, donde el i. a. por si solo no presentó efecto alguno. La formulación comercial resultó más dañina que el efecto sumado de los componentes por separado: dicloruro de paraquat y lissapol NX. El aumento de la permeabilidad en el micelio por efecto del surfactante pudo ser el factor determinante en el aumento de la supresión en la liberación de oxígeno por el herbicida (Wilkinson & Lucas, 1969).

El paraquat es capaz de ser reducido en distintos organismos bajo la presencia de NADPH o un sistema generador de éste y oxígeno molecular. Las reacciones llevadas a cabo para la formación de EROs son dependientes tanto de la concentración del herbicida como de oxígeno, donde también la limitación de O₂ favorece la reacción entre el paraquat reducido en el ciclo y el radical

superóxido para continuar la reacción a pesar de la falta de oxígeno molecular por el mismo efecto herbicida (Hassan, 1984).

En discos de hoja de espinaca la reducción en la liberación de oxígeno es una consecuencia directa del herbicida al operar catalíticamente con la concentración de O_2 en el cloroplasto, permitiendo la rápida reducción-oxidación del herbicida para la formación de superóxido y peróxido inicialmente. Por otro lado el forzado bombeo de electrones en el transporte electrónico lineal permite la transferencia directa de electrones desde el agua pasando por los fotosistemas y nuevamente al agua sin la liberación neta de O_2 . Este proceso aumenta la energización de la membrana del tilacoide llevando a un cambio del gradiente de protones transtilacoidal (ΔpH), modificando recíprocamente la función y componentes de la cadena de transporte de electrones fotosintética, la disipación del exceso de energía por diferentes vías y el proceso de fijación de carbono y las moléculas de reserva (Neuhaus & Stitt, 1989).

D. Rendimiento fotosintético del PSII por emisión de fluorescencia de la clorofila a

I. Transporte de electrones y disipación del exceso de energía de excitación

En la presente investigación el valor del rendimiento cuántico máximo en el estado adaptado a la luz (F_V'/F_M') disminuyó significativamente ($p < 0.05$) en 41.71% y 42.83% con la aplicación de MV y PQ respectivamente con las máximas concentraciones utilizadas (Figura 17). Este parámetro señala que la eficiencia del atrapamiento o de transferencia de energía de excitación desde el LHCII hasta el PSII RC es gravemente afectada con la aplicación del herbicida de manera dependiente de la dosis con particular actividad de PQ en este rubro.

La disminución de este parámetro se debió a la leve reducción de F_o' y en gran medida de F_M' , donde F_o' se puede relacionar al aumento del proceso de disipación en la antena o de excesiva degradación de la proteína DI del complejo PSII, mientras la fuerte reducción de F_M' se asocia con el aumento de la disipación térmica a nivel del PSII por la falta de centros de reacción abiertos o activos (Figura 26) para la relajación fotoquímica (qP) generando saturación lumínica. Estos resultados se relacionan directamente al rendimiento cuántico operacional del PSII (Φ_{PSII}) ($(F_M' - F_s')/F_M'$) que a su vez reduce el transporte electrónico aparente (ETR) (Figura 18) y modifica la disipación del exceso de energía por vías no fotoquímicas (NPQ, Figura 19) .

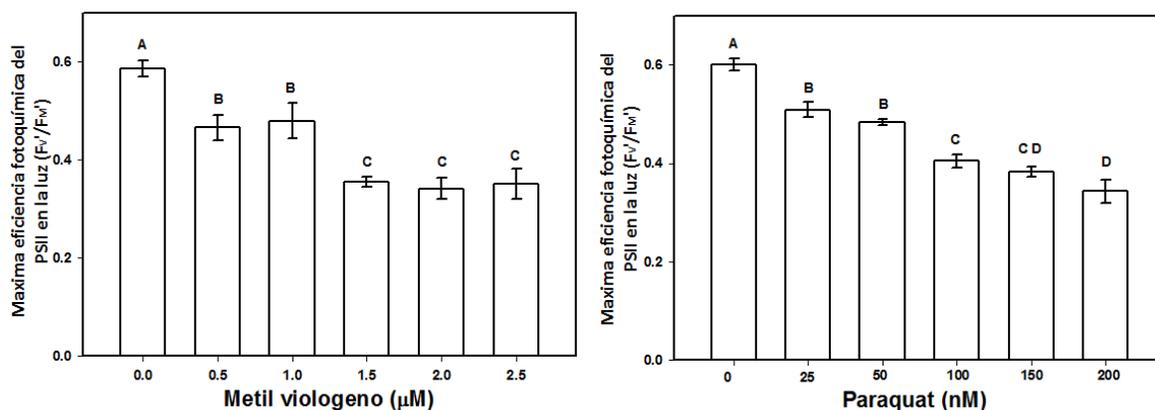


Figura 17. Efecto de las concentraciones de MV y PQ sobre el rendimiento fotoquímico máximo a la luz (o rendimiento cuántico de los centros de reacción abiertos del PSII, F_v'/F_m') de *C. vulgaris* tras 72h de exposición (Las letras indican diferencias significativas según la prueba de Tukey $p < 0.05$).

Los resultados encontrados en esta investigación son similares a los reportados por Ekmekci y Tercioglu (2005) sobre el efecto de PQ (0-60 μM) sobre plántulas de variedades silvestres y cultivadas de trigo. En el cloroplasto el daño por paraquat tuvo una dependencia de la dosis que se refleja en la reducción del rendimiento cuántico máximo para la fotoquímica primaria (F_v/F_m) expresando el deterioro en la cadena de transporte de electrones. Como consecuencia se redujo la efectividad de la captura de energía de excitación (F_v'/F_m'), la eficiencia para la conversión fotoquímica de dicha energía (Φ_{PSII}) y la velocidad del transporte electrónico a nivel del PSII (ETR) demostrado por los parámetros de fluorescencia y que en conjunto se pueden referir a daños por estrés oxidante y lumínico a causa del herbicida. Complementariamente ante la toxicidad de PQ los organismos silvestres analizados resultaron ser mucho más susceptibles que los cultivares, presentando mayores niveles de filtración electrolítica y malondihaldeido como reflejo del daño membranal además de mayor actividad de algunas enzimas antioxidantes (POD especialmente) a diferencia de los cultivares (SOD).

La respuesta de *C. vulgaris* a MV y PQ sobre el transporte electrónico aparente (ETR_{ap}) se muestra en la figura 18 funcionando como un índice general del rendimiento fotosintético que varía según la iluminación, el factor de absorción de una especie y el estado de los acarreadores electrónicos. Ambos compuestos redujeron significativamente ($p < 0.05$) este parámetro un 46.68% y 47.52% con MV y PQ a las máximas concentraciones usadas siendo ligeramente mayor el efecto de PQ.

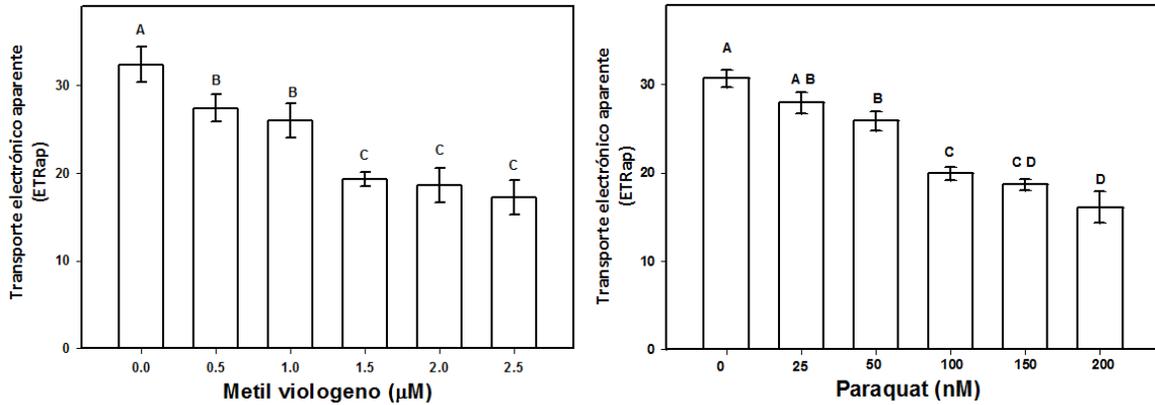


Figura 18. Efecto de las concentraciones de MV y PQ en la tasa de transporte electrónico aparente (ETR_{ap}) en *C. vulgaris* tras 72h de exposición (Las letras indican diferencias significativas según la prueba de Tukey $p < 0.05$).

En la investigación hecha por Dayan y Zaccaro (2012) para caracterizar el efecto de compuestos con diferentes modos de acción herbicida, los inhibidores del PSII y PSI tiene mayor efecto sobre la emisión de fluorescencia de la clorofila a , seguidos de los inhibidores de la síntesis de carotenoides y generadores de EROs. Reportan que paraquat se diferencia de los inhibidores del PSII por no estimular la emisión de fluorescencia de las muestras (cotiledones de pepino) dentro del periodo de incubación en la oscuridad por 18 horas posterior a la aspersión de una solución 100 μ M. No obstante, después de analizar la emisión de fluorescencia tras un periodo de 6 hrs en iluminación los valores de ETR disminuyeron drásticamente. Igualmente señalan que la emisión de fluorescencia puede ser ligeramente modificada por el estrés oxidante, la peroxidación lipídica y la disminución en el contenido de carotenoides al inducir fluorescencia de manera indirecta.

Chagas y colaboradores (2008) reportan de manera similar que la aplicación de MV (2mM) en hojas de caña azucarera provoca la reducción nuevamente de F_v/F_m , Φ PSII y ETR, donde este último se atribuye a la desactivación de la cadena de transporte de electrones debido a una alta concentración de H_2O_2 por la inactividad de APX en el cloroplasto por acción del herbicida. Estos procesos llevaron a la acumulación del exceso relativo de energía a nivel del PSII (obtenida por Chagas con la fórmula: $EXC = [(F_v/F_m) - (\Delta F/F_m')]/(F_v/F_m)$) evidenciando procesos de saturación lumínica o fotoinhibición por paraquat pese al bajo nivel de iluminación al que fueron sometidas tales muestras (750 μ moles \cdot m² \cdot s⁻¹ con fotoperiodo de 12 hr).

Este exceso de energía en el cloroplasto no puede ser liberado por conversión fotoquímica por lo que influyen mecanismos de disipación no radiantes denominados decaimiento no fotoquímico (NPQ por sus siglas en ingles). Éste se conforma de tres componentes diferentes: qE, el componente dependiente de energía relacionado con la formación del gradiente de protones en la membrana del tilacoide (Δ pH) y simultáneamente el ciclo de las xantofilas, qT el componente dependiente del estado de transición encargado de la distribución de la energía entre fotosistemas por el movimiento reversible de una porción del LHCII y qI el componente de decaimiento fotoinhibitorio y que es causado por saturación lumínica.

El efecto de PQ sobre la lenteja de agua *L. minor* provoca un fuerte aumento del NPQ a una concentración 1 μ M tras 48 h de exposición, mientras la reducción de los indicadores del estado

fotosintético F_v/F_M (14%), F'_v/F'_m (7%) y Φ_{PSII} (52%) fueron significativos solo hasta la aplicación de 10 μM en el mismo periodo, indicando que el valor de NPQ resulta más sensible para la evaluación del herbicida. Para estudiar a fondo el efecto en la disipación térmica se examinaron las cinéticas de relajación utilizando DCMU y luz saturante para establecer la contribución de cada componente de NPQ con la aplicación de PQ. Los resultados demostraron que (qE) fue el mayor componente por la proporción que representó, lo cual resulta lógico por la generación del gradiente de protones transtilacoidal (ΔpH) producto del aumento del transporte lineal por el secuestro de electrones que genera PQ en el PSI. Este aumento de qE redujo directamente a qT, indicando que la aplicación de paraquat evita que el exceso de fotones a nivel del PSI sea eliminado adecuadamente, mientras el componente de foto inhibición qI no resulto afectado con la aplicación de PQ a 10 μM (Frankart *et al.*, 2003).

Este fenómeno en los componentes de NPQ puede explicarse según lo reportado por Mullineaux y Allen (1990) donde el paraquat propicia un cambio preferencial al estado 1 inducido por luz en el cual el LHCII se queda acoplado al PSII. Esto ocurre posiblemente debido a que el paraquat es capaz de inhibir la fosforilación del LHCII en tilacoides de chícharo y/o por la presión que ejerce inhibiendo el flujo cíclico alrededor del PSI al desviar los electrones lejos de los componentes envueltos en este proceso y que estimula la oxidación del pool de plastoquinona propiciando el estado 1.

En la presente investigación el efecto de MV y PQ sobre NPQ se muestra en la figura 19 donde ambos compuestos presentaron diferencias significativas respecto al control ($p < 0.05$) con particulares tendencias. MV mostró mayor estímulo de la disipación respecto al control a 1.5 μM (51.89%) seguido de 0.5 μM (37.65%), 2.0 μM (34.55%), 1.0 μM (21.49%) y 2.5 μM (18.7%). Por su parte PQ generó una máxima disipación con 25nM (85.13%) con la reducción progresiva a 50nM (49.53%) y 100nM (18.22%) aumentando nuevamente con 150nM (51.88%) y 200nM (62.2%) teniendo en promedio un mayor estímulo de la disipación térmica comparado con MV.

Se sabe que los cambios fisiológicos que conforman el NPQ no se relacionan linealmente con el aumento o disminución de F'_v/F'_m , ya que estos procesos fisiológicos no permiten una evaluación directa de cambios en Φ_{PSII} , que podrían ser atribuibles al parámetro medido como NPQ, es decir, existe una relación directa entre F'_v/F'_m y Φ_{PSII} mientras NPQ es explicado en términos diferentes de la eficiencia fotosintética.

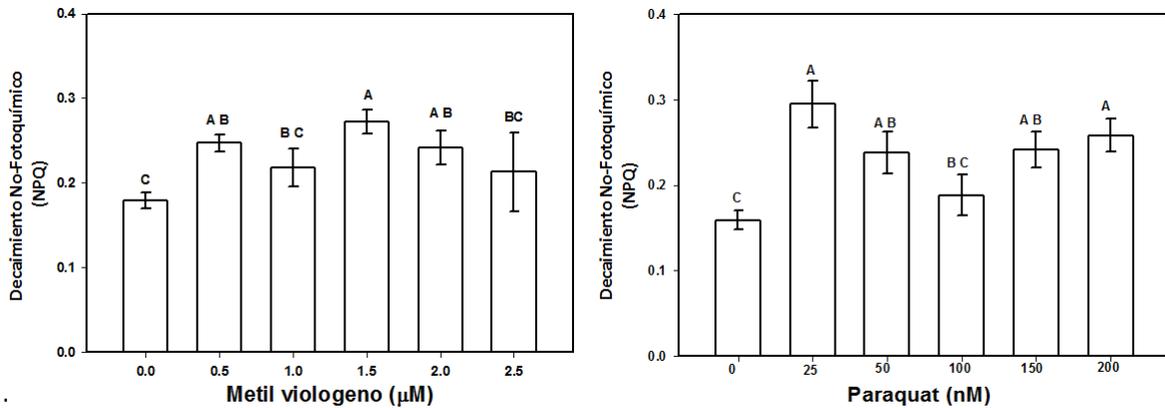


Figura 19. Efecto de las concentraciones de MV y PQ en la relajación térmica NPQ (Non Photochemical Quenching) de *C. vulgaris* tras 72 h de exposición (Las letras indican diferencias significativas según la prueba de Tukey $p < 0.05$).

Hidrig y Schreiber (2007) reportan que el efecto de 2 μM de PQ sobre hojas de tabaco utilizando imágenes de fluorescencia y un marcador de EROs se aprecia el aumento de NPQ particularmente en el sitio de infiltración del herbicida sin una equivalente respuesta del ΦPSII o F_v/F_m . Aunque igualmente el daño físico y fotónico por si solo produce cambios en la emisión de fluorescencia y la relajación térmica, en la región con PQ a una iluminación de $375 \mu\text{moles}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ se perdió la señal de NPQ presuntamente por el fuerte daño oxidativo. Complementariamente al evaluar ΦPSII y NPQ en curvas de saturación lumínica estos valores no se modificaron, sin embargo al evaluar las mismas curvas tras ser expuestas a $35 \mu\text{moles}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ por 15 minutos tanto ΦPSII como NPQ mostraron reducciones significativas evidenciando que la reducción de estos parámetros ocurren una vez que la capacidad desintoxicante es superada (tras la pre-exposición) y que la pérdida de NPQ no se relaciona exclusivamente con una fuerte intensidad lumínica al aplicar paraquat.

De hecho Kotobova y colaboradores (2008) reportan que la aplicación de una concentración mayor de MV (10 μM) sobre hojas de cebada a una intensidad lumínica relativamente baja ($100 \mu\text{moles}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ por 5 hr) no tuvo efecto en F_v/F_m , pero redujo el ETR acompañado de un inusualmente bajo NPQ a pesar de las extrañamente altas cantidades de zeaxantina. La formación de zeaxantina por la acción de la violaxantina de-epoxidasa depende de la acidificación del lumen (pH 5.8- 6.3), lo cual ocurre normalmente como resultado de una alta intensidad lumínica para proteger las antenas formando centros disipadores.

Sin embargo en este caso la acidificación del lumen por MV bajo condiciones de luz limitante pudo propiciar la formación de zeaxantina, pero no fue lo suficientemente ácido (pH 5.2) para activar la formación de centros disipadores en el tilacoide reflejándose en un bajo nivel de NPQ. Entre otros factores limitantes la falta de NADPH como co-sustrato necesario para la reversiva epoxidación de anteraxantina y zeaxantina también pudo contribuir a tal acumulación o igualmente la liberación de violaxantina de los LHC a la fase lipídica de las membranas tilacoidales pudo ser un paso limitante para la de-epoxidación a zeaxantina.

II. Análisis de la fluorescencia polifásica de la clorofila a del PSII

Los parámetros obtenidos con PAM indican a grandes rasgos el daño provocado por paraquat, sin embargo los eventos de absorción, distribución y uso de la energía de excitación pueden ser expresados de mejor manera con el análisis de la fase rápida de la fluorescencia polifásica de la clorofila a del PSII.

Parte de la energía que no es utilizada en la fotoquímica o se disipa como calor es re-emitida en forma de fluorescencia y dado que los tres eventos se relacionan entre sí el cambio de alguno afectará los otros dos. Al iluminar muestras fotosintéticas después de un periodo en oscuridad, la intensidad de la fluorescencia de la clorofila a presenta cambios característicos llamados inducción de la fluorescencia, curva de fluorescencia o efecto Kautsky en honor a su descriptor, compuesta de una fase rápida (menor a un segundo) de aumento y una lenta (dentro de varios minutos) de disminución. En esta fase rápida se localizan cuatro inflexiones principales que abordan desde la mínima intensidad de la fluorescencia (F_0) en la inflexión O dentro de los primeros 50 μ s, J e I como fases intermedias a 2 y 20 ms respectivamente y P como el punto máximo (F_M) de la fluorescencia y que se alcanza en un tiempo determinado por el experimento. Para fines prácticos a la fase rápida se le denomina OJIP, aunque más inflexiones suelen aparecer bajo determinadas condiciones experimentales.

Los cambios en la fluorescencia dentro de esta fase rápida hasta alcanzar P se correlacionan a la sucesiva reducción de los componentes aceptores de electrones en la cadena fotosintética. En teoría la conversión fotoquímica del PSII es limitada por el primer aceptor de electrones al que está acoplado: la quinona a (Q_A), por lo tanto el aumento de la fase rápida de la fluorescencia es un reflejo de la concentración de Q_A que se reduce (Q_A^-) según es afectada por la cinética de varias reacciones redox diferentes en la cadena de transporte de electrones fotosintética (Stirbet & Govindjee, 2011). En la Figura 20 se muestra la correspondencia entre el avance de la fase rápida y las reacciones de la cadena transportadora de electrones.

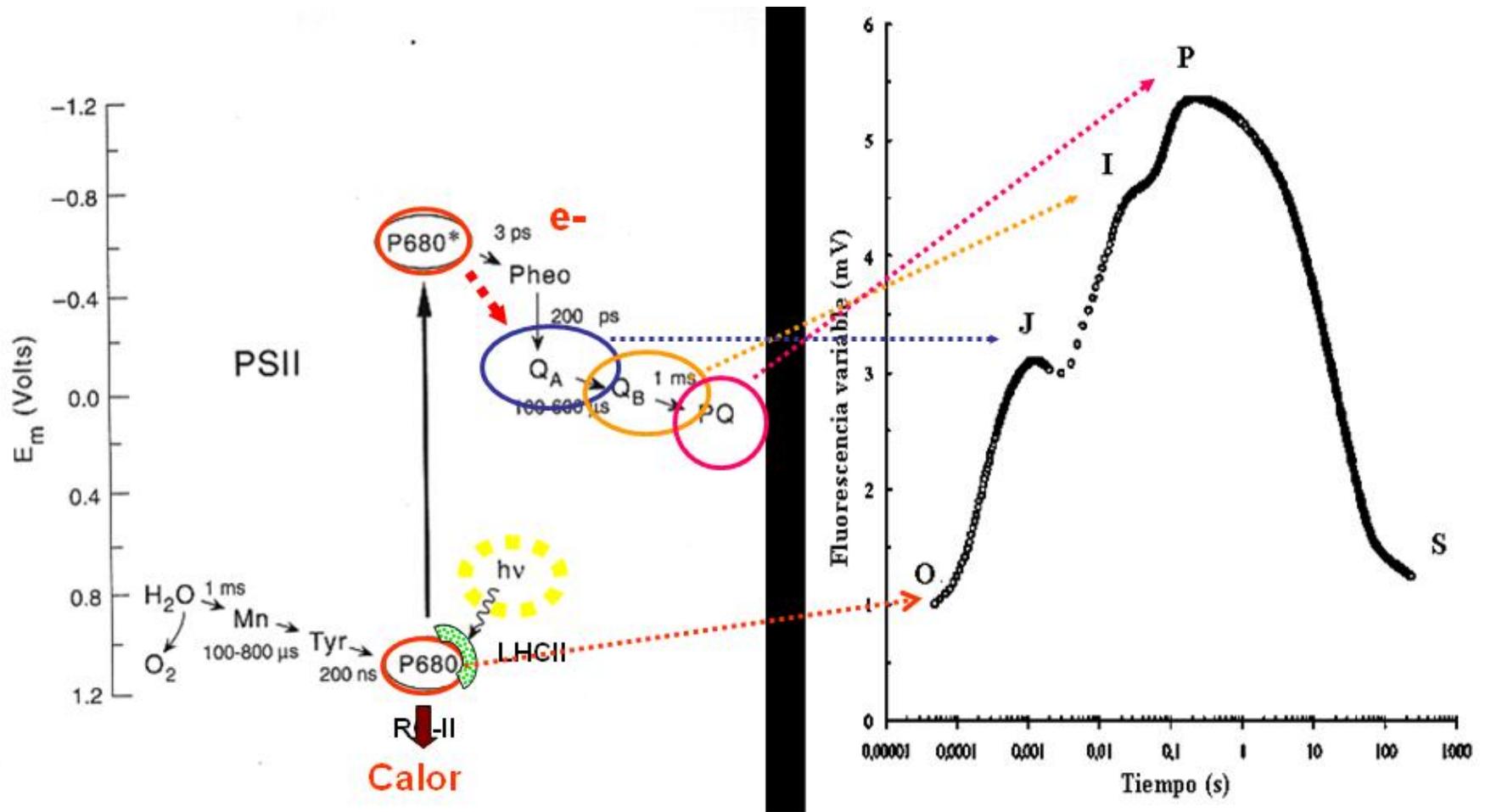


Figura 20. Curva de inducción de fluorescencia de la clorofila a (fase rápida) y su relación con las reacciones de la cadena transportadora de electrones. O, es el valor mínimo de la fluorescencia (F_0). Aparece alrededor de los 20-50 ms y en ese momento todos los centros de reacción están abiertos "oxidados", la relajación o disipación fotoquímica (qP) = 1 y la disipación No-fotoquímica (NPQ) = 0. K, se desarrolla a los 200-300 ms y está relacionado con la actividad del complejo liberador de oxígeno. J, se desarrolla a los 2 ms, y se relaciona con la reducción parcial de la Q_A . I, se desarrolla a los 20 ms y está relacionada con la reducción parcial de Q_A y Q_B . P, es el valor máximo de la fluorescencia (F_M). El tiempo en el que se alcanza depende del protocolo experimental. En este momento todos los centros de reacción están cerrados "reducidos", qP = 0 y NPQ = 1

En la figura 22 se aprecian reducciones de la fluorescencia mínima (F_0) y particularmente en la fluorescencia máxima (F_M) afectando el valor de la fluorescencia variable ($F_V = F_M - F_0$) con el aumento de la concentración de MV y PQ, donde las concentraciones de 100, 150 y 200 nM de PQ mostraron un mayor efecto en los parámetros citados.

El valor de F_0 se asocia con el estado de las antenas y sirve como una medida de la distribución inicial de la energía y la efectividad de la captura de excitación en el PSII, una reducción a este nivel indica que la aplicación de MV y PQ posiblemente propiciaron daños en la membrana del tilacoide disociando parcialmente el LHCII del PSII al exceder la capacidad fotoprotectora de la antena derivando en daño fotónico. El valor de F_M representa el grado de reducción (llenado) del lado aceptor del PSII cuya disminución indica el posible aumento en la clausura de los centros de reacción o disfunciones en la actividad del PSII llevando al desplome de la eficiencia fotoquímica primaria F_V/F_M y propiciando la reducción en la emisión de fluorescencia (Ekmekci & Terzioglu, 2005; Chagas *et al.*, 2009).

Resultados similares fueron reportados por Eullafroy y colaboradores (2007) utilizando PQ Sigma sobre *L. minor* donde el rendimiento cuántico máximo para al fotoquímica del PSII (F_V/F_M) y el nivel de F_M se reducen a concentraciones de 20 y 100 $\mu\text{g/l-1}$ en las primeras 24 hr y posteriormente a las 48 hr con 5 y 10 $\mu\text{g/l}^{-1}$. Argumentan que dicha reducción puede deberse al daño del PSII por la degradación de pigmentos y proteínas de los centros de reacción del PSII mediado por la formación de oxígeno singulete y oxígeno reactivo, relacionándose igualmente con la fuerte inhibición de la liberación de oxígeno en las fondas tratadas con PQ siguiendo la destrucción de proteínas del complejo liberador de oxígeno.

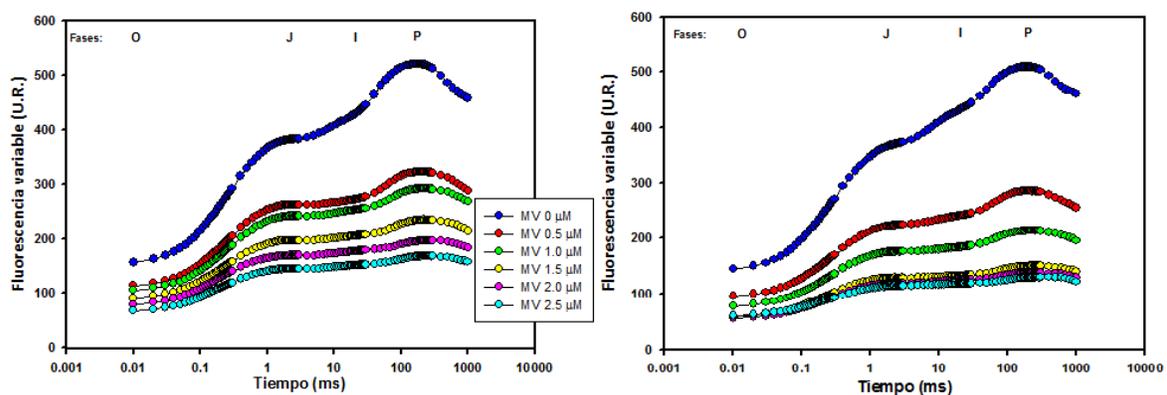


Figura 21. Efecto de las concentraciones de MV y PQ en la fluorescencia variable en *C. vulgaris* tras 72h de exposición.

Como alternativa para la presentación gráfica de estos datos se utiliza la fluorescencia variable relativa a cualquier tiempo t ($Vt = (Ft - F_0) / (F_M - F_0)$). Esta es una doble normalización de la curva de inducción de fluorescencia que permite la comparación de curvas medidas bajo diferentes condiciones y/o en diferentes muestras, convirtiendo intensidades absolutas de fluorescencia en contribuciones relativas de la fluorescencia variable. Esta expresión experimental se toma como una medida de la fracción reducida de Q_A ($Vt = Q_A^- / (Q_A + Q_A^-)$), de este modo la gráfica permite la comparación de muestras considerando solo la acumulación dinámica de Q_A en su forma reducida Q_A^- (Stirbet & Govindjee, 2011) y se presenta en la figura 23.

Aquí se muestra que PQ y MV en el medio provocan que la velocidad inicial de la fluorescencia (Mo) o la pendiente inicial de la cinética medida entre los 50 y 300 μ s se eleve con una relación dependiente a la dosis, representando un aumento en la velocidad del cierre o la reducción de los centros de reacción por la energía proveniente de las antenas.

Igualmente se distingue que el aumento en la concentración provoca que las fases J e I se asemejen cada vez más, indicando que hay un aumento en la reducción de Q_A debido a la limitación del transporte electrónico hacia Q_B promoviendo la oxidación del pool de Pq. También la amplitud de la fase I-P se vuelve menor con el aumento de ambos compuestos respecto a los cultivos control representando una alteración del transporte electrónico desde el pool de Pq al Cyt b6f o paralelamente desde el complejo PSI a la ferredoxina (Fd).

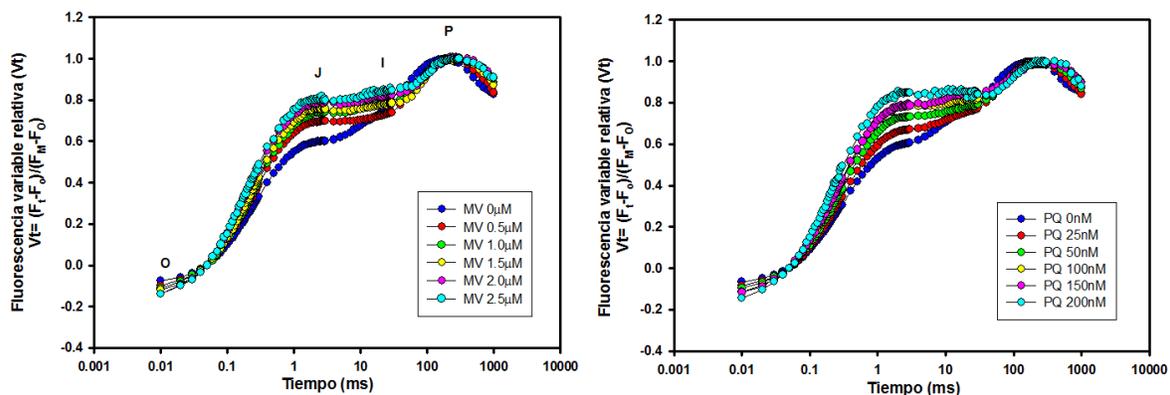


Figura 22. Efecto de las concentraciones de MV y PQ sobre la fluorescencia variable relativa de *C. vulgaris* tras 72 h de exposición.

Shankster y colaboradores (2005) reportan que en hojas de chícharo el nivel de Fo y J de la curva de fluorescencia de la clorofila a no presentan cambios tras la aplicación de 200 μ M de MV, sin embargo encuentra una especial reducción de la fase I-P independientemente de la intensidad lumínica. No obstante es posible que la iluminación aplicada no fuera suficiente para modificar todos los parámetros y que la ausencia de efecto en la cinética de aumento O-J-I indica que el tratamiento con Mv no causó daños foto-oxidativos en sus muestras. Por otra parte en cinéticas normalizadas de adaptación a la oscuridad de la curva de inducción de fluorescencia de la clorofila a seguidas de un pulso de luz roja se obtiene un aumento en la velocidad de la cinética, donde los niveles O y J disminuyen con la aplicación de MV y la región I-P es fuertemente suprimida nuevamente. Argumentan que este cambio en el nivel J refleja una casi completa re-oxidación del pool de Pq.

Igualmente Munday y Govindjee (1969) reporta que MV propicia la desaparición del nivel P en *Chlorella pyrenoidosa* a una concentración 10^{-4} M tras 15 minutos de aplicación, presuntamente relacionado con la oxidación del primer aceptor del PSI pero sin efectos reconocibles en el aumento de la fluorescencia de la fase O-I.

En *L. minor* la reducción de Q_A muestra un aumento del 5% a una concentración de 5 μ g/l⁻¹ y del 74% con 100 μ g/l⁻¹ acompañada de la disipación de la fluorescencia al nivel J y posteriormente del nivel I, demostrando que PQ como aceptor electrónico es un eficiente sumidero de electrones que

propicia el aumento de la disipación térmica y la reducción del transporte electrónico por el aumento del flujo protónico en el interior del tilacoide generando posibles alteraciones en la estructura de proteína-clorofila del PSII (Eullafroy *et al.*, 2007).

Los cambios en la cinética OJIP se observan con mayor detalle al graficar el cambio (Δ) que se da entre el testigo y las muestras experimentales (Figura 23), estas curvas se construyeron restando los valores de la cinética de fluorescencia normalizada de los tratamientos (V_t) al valor de V_t del grupo testigo. Las inflexiones hacia arriba indican inhibiciones en el transporte electrónico e inflexiones hacia abajo reflejan estimulaciones.

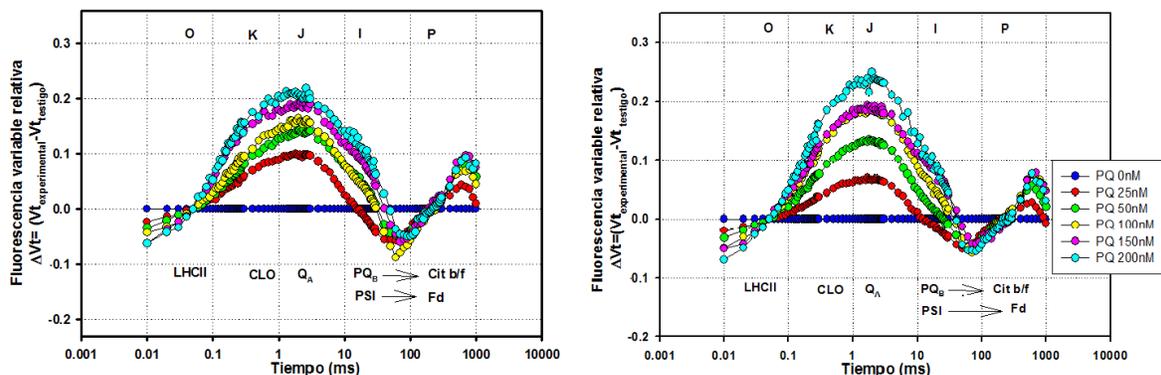


Figura 23. Efecto de las concentraciones de MV y PQ en la fluorescencia variable relativa comparada con el control en *C. vulgaris* tras 72 h de exposición

Para ambos casos se producen inhibiciones del transporte electrónico especialmente al nivel J con una acción ligeramente superior de PQ, demostrando que la transferencia energética después de Q_A es limitada y posiblemente los electrones transportados desde el CLO y la feofitina hacia este nivel fomentan su reducción. Aparentemente este aumento en J conlleva un aumento del nivel K, sin embargo el análisis de la fracción de CLO del PSII (figura 24) permite descartar que el efecto del herbicida interactúa con el CLO en el transporte electrónico lineal.

Posteriormente el efecto característico de MV secuestrando electrones al nivel del PSI es evidenciado por el aumento del flujo electrónico en la región I-P y posteriormente los electrones no llegan a los últimos acarreadores para la formación de NADPH del lado aceptor del PSI reflejado por la inhibición del transporte posterior al nivel P.

Aunque el paso J de la cinética se refiere a la capacidad máxima del pool de Q_A en su estado reducido existiendo una limitación en la aceptación de electrones por Q_B , también puede relacionarse con los estados S del en el complejo separador del agua (CLO) (Eullafroy *et al.*, 2007) pudiendo explicar indirectamente el arrastre en K.

Neuhaus y Stitt (1989) reportan la fuerte oxidación del lado aceptor del PSI en hojas de espinaca con el aumento en la concentración de MV que se acompaña del aumento en la reducción del aceptor Q_A , implicando una restricción sustancial en el transporte electrónico desde el PSII al PSI, similar a los eventos ocurridos cuando la intensidad lumínica es aumentada o cuando la concentración de CO_2 disminuye.

También Shankster y colaboradores (2005) encuentran que la aplicación de MV propicia la oxidación de la poza de Pq producto de la inhibición en el transporte a este aceptor y que relacionaron con el aumento de la fluorescencia al nivel de la fase J-I e igualmente afecciones al nivel de la PC y P700 que causaron la disipación de la fluorescencia en la fase I-P

La estimación de los complejos liberadores de oxígeno activos a partir de los datos obtenidos por emisión de fluorescencia del PSII se realizó considerando los valores de la fluorescencia variable en la fase K ($VK = (F_{300\mu s} - F_0) / (F_M - F_0)$) (Liu *et al.*, 2011). Con esta información se calculó la fracción activa de complejos liberadores de oxígeno después del tratamiento con la siguiente fórmula

$$\text{Fracción de CLO activos} = \frac{\left(1 - \frac{Vk}{Vj}\right)_{\text{experimental}}}{\left(1 - \frac{Vk}{Vj}\right)_{\text{testigo}}}$$

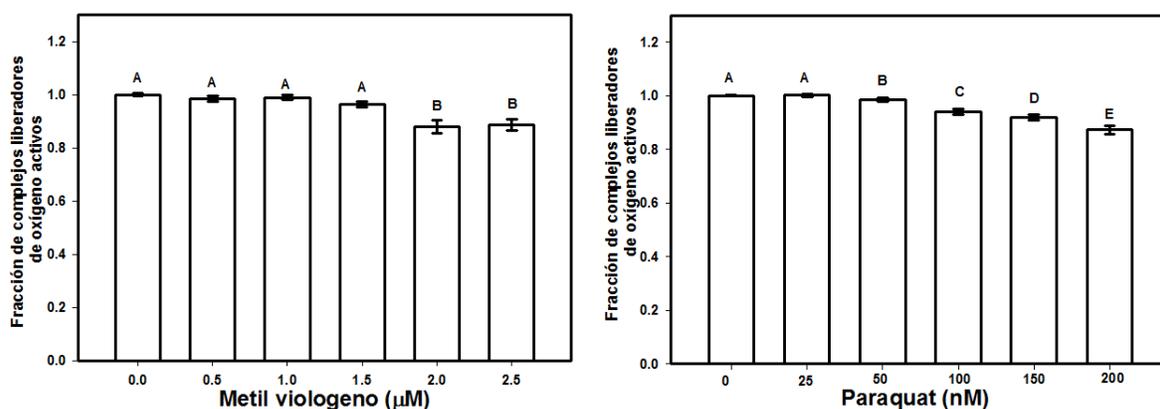


Figura 24. Efecto de las concentraciones de MV y PQ en la fracción de Complejos Liberadores de Oxígeno del PSII en *C. vulgaris* tras 72h de exposición (Las letras indican diferencias significativas según la prueba de Tukey $p < 0.05$).

A pesar del efecto sobre el transporte electrónico no hubo cambios significativos en la fracción de CLOs solo hasta las mayores concentraciones utilizadas (2.0 y 2.5 μM para MV y a partir de 100 nM con PQ), donde PQ resultó ser ligeramente más dañino en este rubro. Aun así la fracción no descendió a menos del 87% (87.22% PQ y 88.74% MV) haciendo suponer que los complejos liberadores de oxígeno no son uno de los blancos iniciales del herbicidas a concentraciones bajas y que posiblemente el daño con las máximas concentraciones es alcanzado solo después de un severo daño general en las células.

III. Estructura y función de los centros de reacción del PSII

El PSII es un complejo proteico con múltiples subunidades alojado en la membrana tilacoidal, se encuentra constituido por un complejo central dimérico donde cada monómero contiene un centro de reacción (RC) y unidades proteicas asociada a pigmentos que conforman el complejo cosechador de luz (LHCII).

El análisis de la cinética de fluorescencia de la clorofila *a* del PSII con la prueba OJIP (Strasser y Strasser, 1995) igualmente se puede modelar estableciendo el destino del flujo de la energía luminosa que recorre el PSII (Force *et al.*, 2003) como se indica en la figura 16.

El modelo permite el cálculo del flujo absorbido (**ABS**), el flujo atrapado (**TR**), el flujo para el transporte electrónico en los acarreadores intermedios de la cadena (**ET**), el flujo disipado como calor (**DI**) y el flujo utilizado para la reducción de los aceptores finales del lado aceptor del PSI (**RE**)

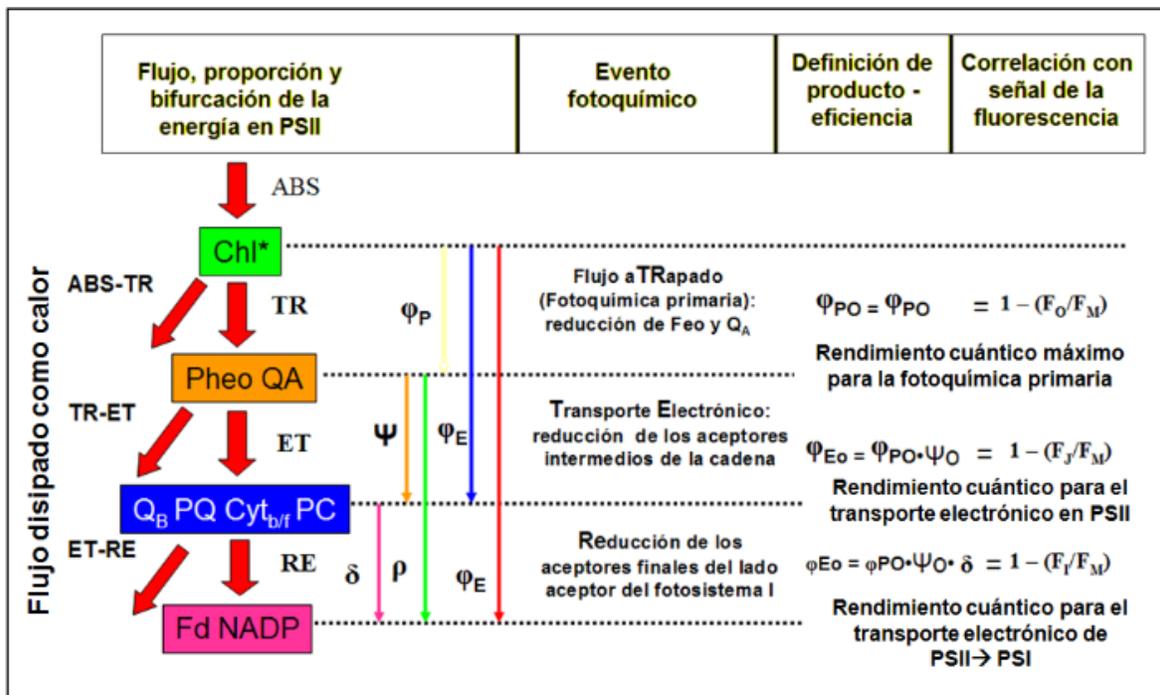


Figura 25. Modelo simplificado del flujo energético a través del PSII, de acuerdo con la prueba OJIP (Tsimilli-Michael y Strasser, 2008).

Igualmente conociendo las inflexiones de la curva, los valores mínimo y máximo (F_0 y F_M) así como la pendiente inicial de la cinética de fluorescencia se pueden calcular los parámetros descritos en la tabla 1 (materiales y métodos) (Van Heerden *et al.*, 2003).

En este estudio, el número de centros de reacción activos (RC/ABS) disminuye significativamente ($p < 0.05$) respecto al grupo testigo conforme aumenta la concentración de MV y PQ (Figura 26). Hubo una reducción del 30.25% y 35.54% con MV y PQ respectivamente con las máximas concentraciones utilizadas, evidenciando que existe un posible daño estructural que compromete la captación de energía para llevar a cabo la fotoquímica primaria (o hay menos centros de reacción capaces de lograr la reducción de Q_A por cada antena del PSII).

La fracción de centros inhibidos en *L. minor* alcanza hasta un 57% aplicando una concentración de $100 \mu\text{g/l}^{-1}$ de MV (Eullafroy *et al.*, 2007) y en un análisis de correlación se sustentó que la reducción en la fracción de centros inhibidos coincide estrechamente con la disminución en el transporte electrónico por centro de reacción (ETo/RC) (Eullafroy *et al.*, 2009)

Esta disminución en la fracción de centros de reacción puede ser una consecuencia de la inhibición de la abundancia en la transcripción de los genes *psbA* y *chl/L*, cuyas funciones codificando a la proteína integral de membrana en el PSII (proteína D1) y para una subunidad de la protoclorofilida reductasa envuelta en la formación de clorofila a respectivamente (Zhang *et al.*, 2014) serian

pasos que podrían comprometer directa o indirectamente la funcionalidad de los centros de reacción.

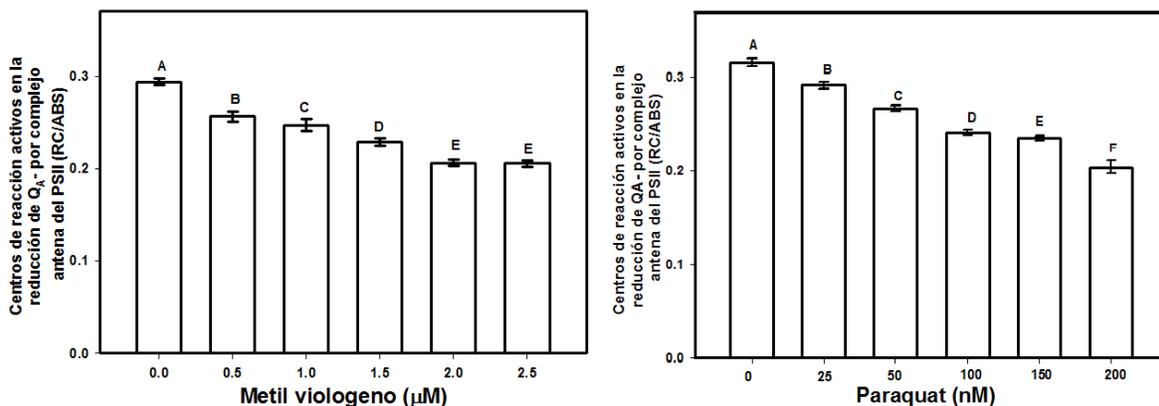


Figura 26. Efecto de las concentraciones de MV y PQ en el número de centros de reacción activos en la reducción de Q_A por complejo antena del PSII en *C. vulgaris* tras 72h de exposición (Las letras indican diferencias significativas según la prueba de Tukey $p < 0.05$).

Sin embargo aunque en la presente investigación disminuye la cantidad de centros funcionales, los centros activos tuvieron mayor transferencia energética (absorción) para lograr la reducción de Q_A . La Figura 27 muestra un aumento del 43.32% y 65.60% con Mv y PQ respectivamente sobre el flujo absorbido por centro de reacción (ABS/RC) bajo las máximas concentraciones aplicadas con un aumento en la absorción dependiente de la dosis en el medio. Esto concuerda con los datos emitidos por OJIP donde el aumento de la pendiente se relaciona a un mayor flujo de excitación que absorben los centros de reacción aumentando el nivel de fluorescencia al inicio de la curva.

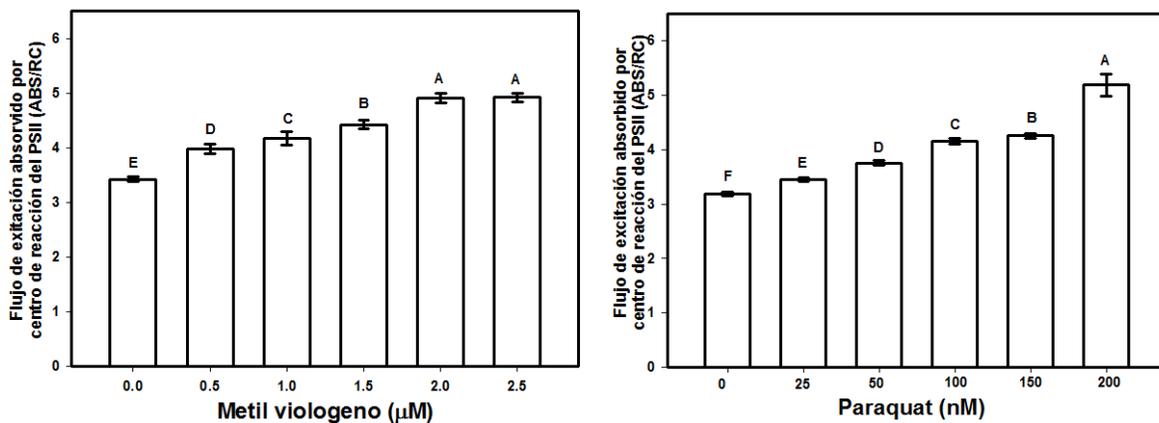


Figura 27. Efecto de las concentraciones de MV y PQ en el flujo de excitación absorbido por centro de reacción del PSII en *C. vulgaris* tras 72 h de exposición (Las letras indican diferencias significativas según la prueba de Tukey $p < 0.05$).

Resulta contradictorio que exista menor número de centros de reacción activos y mayor absorción de éstos, lo cual puede ser explicado según dos teorías:

1) Hay una fracción de centros de reacción del PSII desactivada e incapaz de reducir Q_A , en este caso el rendimiento cuántico máximo del PSII para la fotoquímica primaria (Φ_{PO}) disminuye inversamente y la capacidad de atrapar la energía de excitación para reducir Q_A ($TRO/RC = Mo - (1 - V_j)$) no se afecta (Figura 28).

Esta hipótesis es soportada por Eullafroy y colaboradores (2009) encontrando que MV no altera el atrapamiento de los centros de reacción (TR/RC) pero reduce el valor de F_V/F_M y aumenta la energía de excitación en la antena de un centro de reacción activo (ABS/RC) en 200% llevando al incremento de la disipación efectiva con solamente $100 \mu\text{g/l}^{-1}$ ($0.38 \mu\text{M}$ aprox.).

Comparativamente en la presente investigación se dio la reducción de F_V/F_M , el aumento de la absorción (ABS/RC) aunque no tan marcado y un significativo aumento del atrapamiento (TR/RC) solamente con las mayores concentraciones utilizadas de ambos compuestos (figura 28) llevándonos a la segunda hipótesis.

II) Hubo un aumento de tamaño del complejo antena del PSII (LHCII). En este caso F_V/F_M no sería afectado y el atrapamiento de la energía de excitación para reducir Q_A (TRO/RC) aumentaría proporcionalmente a la absorción por centro de reacción del PSII (ABS/RC).

Los resultados indican que PQ causa una obvia disminución de los RC activos del PSII y de la tasa del transporte electrónico dado que dichos centros son incapaces de reducir Q_A y el flujo energético para la disipación por centro de reacción aumenta, no obstante es posible un incremento del tamaño promedio de la antena en los centros de reacción activos remanentes como se ha visto en la exposición de *L. minor* a cromo (Eullafroy *et al.*, 2009).

En la Figura 28 se muestra que el aumento en la concentración de MV y PQ es diferente en el flujo de excitación atrapado por centro de reacción que lleva a la reducción de Q_A (TRO/RC), mostrando diferencias significativas solo a mayores concentraciones de cada compuesto ($p < 0.05$). MV provocó un aumento del 9.28% y 9,85% con 2.0 y 2.5 μM respectivamente, sin embargo PQ tuvo mayor diferencia significativa aumentando un 5.42%, 7.03% y 12.47% con 100, 150 y 200 nM respectivamente.

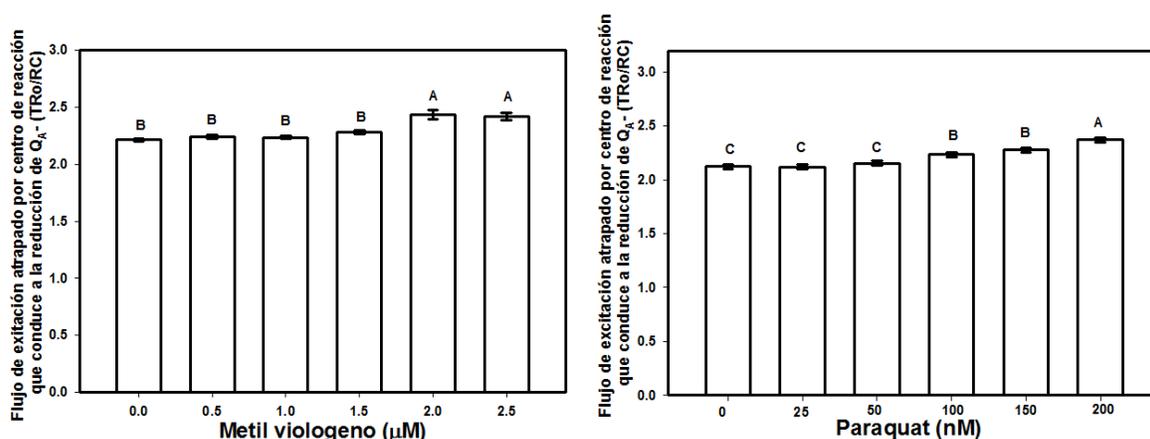


Figura 28. Efecto de las concentraciones de MV y PQ en el atrapamiento por centro de reacción que conduce a la reducción de Q_A en *C. vulgaris* tras 72 h de exposición (Las letras indican diferencias significativas según la prueba de Tukey $p < 0.05$).

Este ligero aumento en TRO/RC señala que Q_A fue completamente reducida pero no es capaz de re oxidarse. En este caso, la re oxidación de la Q_A - y la energía máxima se debe disipar lo que significa que aunque el atrapamiento aumentó éste no se aprovecha para el transporte

electrónico demostrado por la inhibición en el transporte por centro de reacción representando el transporte electrónico a Q_B (ET/RC).

Sin embargo la variación en TRo/RC no afecta tan representativamente al ET/RC dado que el cálculo de este parámetro contempla igualmente a la probabilidad de que un electrón atrapado sea transportado mas allá de Q_A (Ψ_O) (figura 31), donde esta probabilidad es la que compromete en mayor medida el valor de ET/RC mostrado en la figura 24. La inhibición encontrada en el flujo electrónico fue del 42.83% y 52.76% con MV y PQ respectivamente indicando que el aumento de la concentración del herbicida no permite que la mayoría de los electrones presentes a nivel de Q_A sean utilizados en la fotosíntesis.

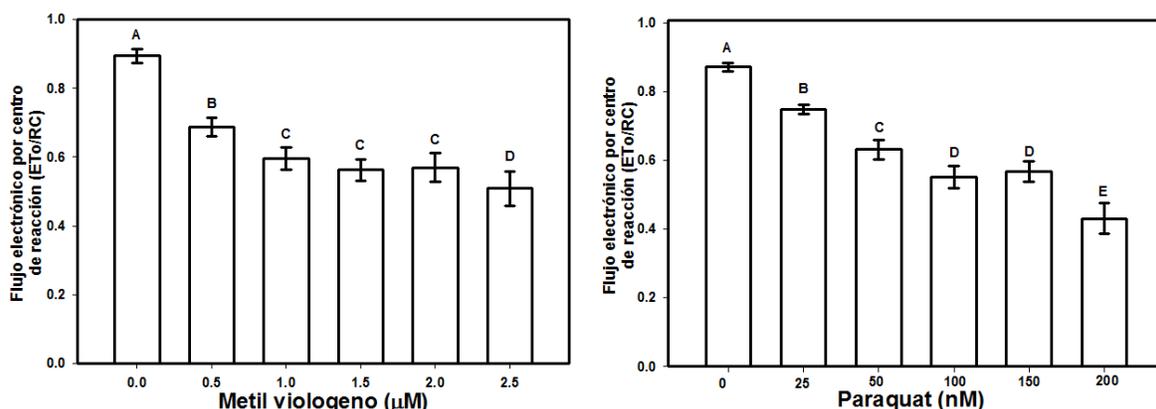


Figura 29. Efecto de las concentraciones de MV y PQ en el flujo electrónico por centro de reacción (ET/RC) de *C. vulgaris* tras 72 h de exposición (Las letras indican diferencias significativas según la prueba de Tukey $p < 0.05$).

IV. Actividad y rendimiento cuántico del PSII

En la figura 30 se muestra que conforme aumenta la concentración de MV y PQ se reduce significativamente ($p < 0.05$) el rendimiento cuántico máximo para la fotoquímica primaria ($TRo/ABS = F_V/F_M = \Phi_{PO}$) como previamente se citó. La máxima concentración de MV redujo este parámetro un 21.53% mientras PQ produjo hasta un 28.08% de inhibición.

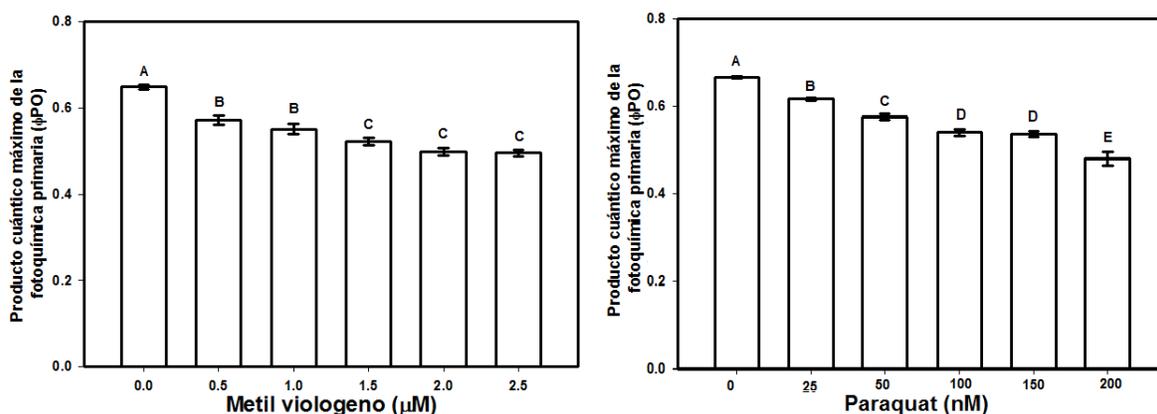


Figura 30. Efecto de las concentraciones de MV y PQ en el producto cuántico máximo de la fotoquímica primaria (Φ_{PO}) de *C. vulgaris* tras 72 h de exposición (Las letras indican diferencias significativas según la prueba de Tukey $p < 0.05$).

Este valor representa la eficiencia cuántica máxima para la fotoquímica del PSII a la cual la luz absorbida es utilizada para reducir Q_A , reflejando el rendimiento cuántico potencial del fotosistema y sirve como un indicador sensible al cambio fotosintético de organismos vegetales. Es sabido que el valor de F_V/F_M varía entre taxones por cambios en el arreglo de pigmentos y la estructura celular, sin embargo ante la mezcla de factores bióticos y abióticos que modifican el rendimiento fotosintético este parámetro resulta de los más sensibles y útiles para el análisis de contaminantes (Kumar *et al.*, 2014).

La reducción en los valores de F_V/F_M ha sido reportada en chícharo, arroz, lenteja de agua y trigo (Frankart *et al.*, 2003, Ekmekci & Terzioglu 2005, Eullafroy *et al.*, 2007, Gou *et al.*, 2007, Eullafroy *et al.*, 2009, Rodriguez *et al.*, 2012), donde de manera regular se citan alteraciones en la actividad metabólica antioxidante, el gradiente de protones de tilacoide y la destrucción de los complejos proteína-membrana que conforman al aparato fotosintético a causa de la formación de especies reactivas de oxígeno.

Pese a que estos cambios estructurales y metabólicos provocan la disminución en el transporte a Q_A , se logra la total reducción de este pero no el completo acarreo hasta el segundo aceptor Q_B donde los resultados obtenidos se muestran en la figura 26 sobre la probabilidad de que un electrón atrapado se mueva después de Q_A (Ψ_O). Con las máximas concentraciones utilizadas se logro la reducción del 49.49% y 53.27% con MV y PQ respectivamente demostrando que la aplicación de ambos compuestos obstruyen el transporte más allá de Q_A y por tanto su re-oxidación.

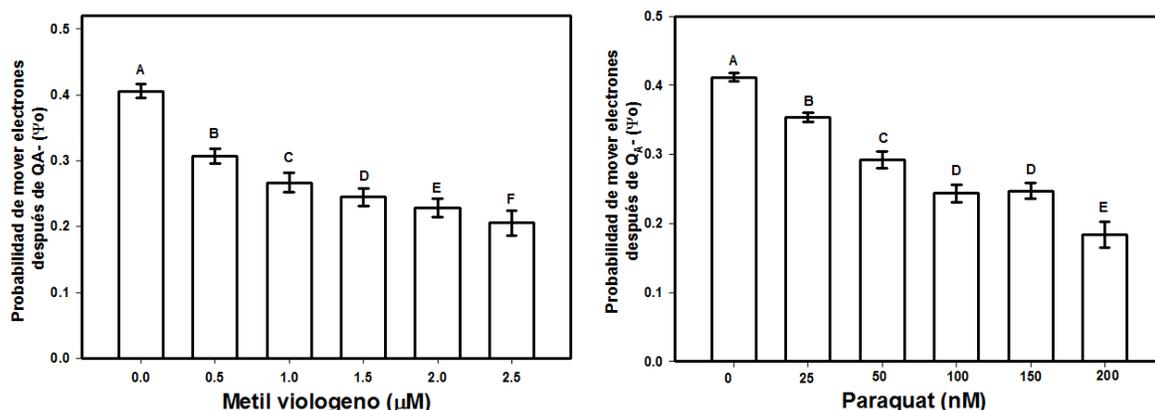


Figura 31. Efecto de las concentraciones de MV y PQ en la probabilidad de que un electrón atrapado se mueva mas allá de Q_A (Ψ_O) en *C. vulgaris* tras 72 h de exposición (Las letras indican diferencias significativas según la prueba de Tukey $p < 0.05$).

En conjunto el valor del rendimiento cuántico para la fotoquímica primaria Φ_{PO} y la probabilidad de que un electrón atrapado sea movido mas allá de Q_A (Ψ_O) afectan el valor del producto cuántico máximo para el transporte de electrones en el PSII (Φ_{EO}) mostrado en la figura 32, donde MV y PQ causaron una reducción del 58.22% y 63.80% respectivamente con las máximas concentraciones utilizadas sugiriendo que se afecta tanto al lado donador como al aceptor del PSII.

Estos valores concuerdan con los resultados obtenidos por Eullafroy (2009) donde igualmente se cita la reducción del nivel de Φ_{PO} y Ψ_O llevando a la disminución del rendimiento cuántico del

transporte en el PSII (Φ_{EO}), argumentando que estos resultados no se deben a un objetivo específico de las reacciones de la fase dependiente de la luz (Φ_{PO}) ni por las reacciones independientes a la intensidad lumínica (Ψ_0) si no que ambos contribuyen de modo similar.

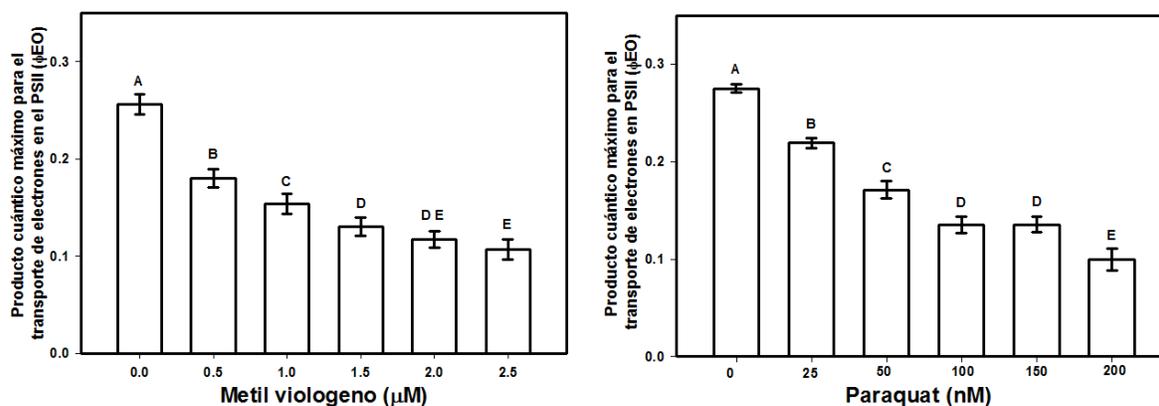


Figura 32. Efecto de las concentraciones de MV y PQ en el rendimiento cuántico máximo para el transporte de electrones en el PSII (Φ_{EO}) en *C. vulgaris* tras 72 h de exposición (Las letras indican diferencias significativas según la prueba de Tukey $p < 0.05$).

Ya que el efecto del herbicida es primordialmente sobre el PSI es necesario analizar el flujo energético a este nivel, en la figura 33 se muestra la probabilidad de que un electrón proveniente de los acarreadores intermedios reduzca a los acarreadores del lado aceptor del PSI (δR_0).

El efecto de ambos compuestos produjo diferencias significativas ($p < 0.05$) con todas las concentraciones pero con diferentes tendencias entre sí. Con MV hubo un mayor efecto aplicando 1.5 μ M aumentando la probabilidad un 90.13% y posteriormente el valor desciende hasta 23.13% con la máxima concentración. PQ por su parte aumenta de modo más uniforme hasta un 95.58% con la máxima concentración utilizada, mostrando diferencias significativa con el grupo control.

Estas variaciones reflejan que MV impulsa el transporte electrónico hasta cierta concentración estimulado el flujo desde Q_B hacia los aceptores del PSII ($Q_B - Pq - Cit_{b6/f} - PC$) pudiendo también asegurar el transporte hasta los aceptores A_0 , A_1 , $Q_{A/B}$ y los centros ferrosulfurados, pero el aumento de la concentración puede provocar que la demanda electrónica del herbicida afecte con mayor intensidad la reducción de los aceptores (que siguen) disminuyendo el valor de δR_0 . Por su parte el efecto de PQ es dependiente de la dosis estimulando el transporte electrónico después del PSII, donde la concentración al ser relativamente mucho menor se comporta de modo similar a las menores concentraciones de MV

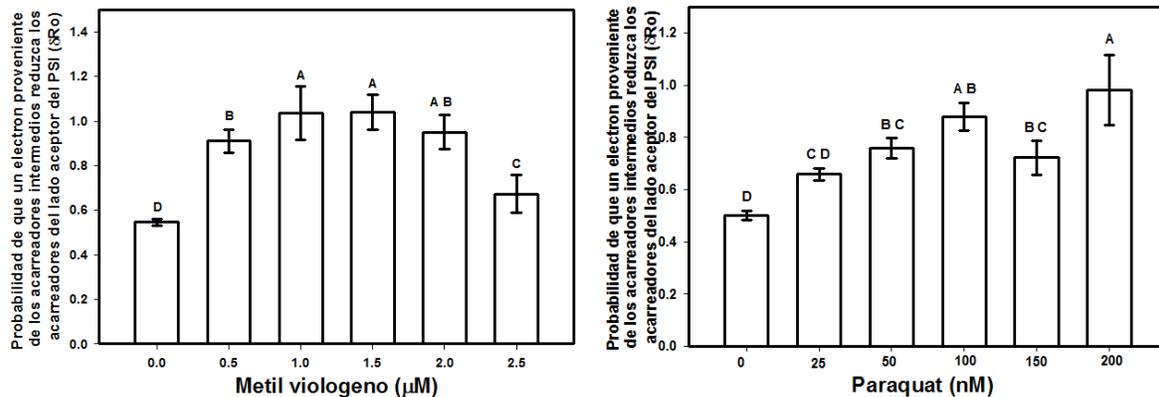


Figura 33. Efecto de las concentraciones de MV y PQ en la probabilidad de que un electrón proveniente de los acarreadores intermedios reduzca a los acarreadores del lado aceptor del PSI (δR_o) en *C. vulgaris* tras 72 h de exposición (Las letras indican diferencias significativas según la prueba de Tukey $p < 0.05$).

Schansker y colaboradores (2005) determinaron la actividad del PSI utilizando los cambios de absorbancia a 820nm y encontraron que la aplicación de MV inhibe gravemente pero no por completo la reducción de PC y P700 evitando que los electrones provenientes del pool de PQ alcancen a estos acarreadores con el primer pulso reductor. Con el pulso rojo lejano la tendencia es diferente, donde el parcialmente reducido pool de PQ reduce momentáneamente a PC+ y P700+ seguido de la completa oxidación de la cadena. Finalmente el segundo pulso rojo logra un ligero estímulo de la transmisión llegando a un estado estable similar al del final del primer pulso demostrando que los acarreadores permanecen mayormente oxidados. Sin embargo al hacer el análisis sin el pulso oxidante la re-reducción de PC y P700 se logra a los 100 ms bajo condiciones de luz roja saturante tras la aplicación de una solución de MV 200 μM con una brocha fina en hojas de chícharo.

Igualmente la integridad de la membrana para la preservación de la PC es determinante en la efectividad de MV, pues se sabe que la liberación de este acarreador en la membrana del tilacoide es capaz de inhibir la fotoreducción del compuesto comprometiendo la actividad herbicida medida por liberación fotosintética de oxígeno (Katoh, 1972).

Estos hallazgos sustentan que a pesar de que el herbicida limita el transporte electrónico permite el flujo hasta los acarreadores del lado aceptor del PSI, sin embargo como se describe a continuación por el modo de acción característico del paraquat no se logra el transporte hasta los últimos acarreadores del lado aceptor del PSI.

El efecto en el rendimiento cuántico para la reducción de los últimos acarreadores del lado aceptor del PSI (ΦR_o) se muestra en la figura 34, habiendo diferencias significativas respecto al control con ambos compuestos. MV en la menor concentración usada aumenta ligeramente el rendimiento un 15.14%, las siguientes dos concentraciones disminuyeron pero no presentaron diferencias estadísticas con el testigo ($p < 0.05$), mientras que con la mayor concentración el rendimiento cae un 9.25% respecto al control. En el caso de PQ, la tendencia es claramente dependiente de la dosis donde el rendimiento cae 60.98% con la última concentración utilizada.

En observaciones previas se creía que el sitio de donación de electrones al MV era cualquiera acarreador del lado aceptor del PSI, sin embargo varios análisis han descartado a los aceptores Ao,A1 y A2. No obstante existe la posibilidad de que el centro ferrorulfurado FeS X pueda donar electrones al centro FeS A pese a su baja afinidad con el herbicida en caso de que el centro FeS B se encuentre ausente, dado que este último es el principal sitio de donación de electrones al paraquat (Fujii *et al.*, 1990)

Sin embargo en la investigación realizada por Setif (2015) analizando la cinética de transferencia d electrones al MV *in vitro* utilizando *Synechocystis* desmiente que el centro FeS B es el principal sitio de donación al MV dado que la dirección del trabajo de Fujii es específicamente en el PSI. En el reporte de Setif fundamenta que la Fdred es ligeramente más afín a ceder electrones para la reducción de MV pese a que los puntos medios de MV y Fa/Fb los hacen más compatibles. Igualmente encuentra que concentraciones similares de MV y FNR en el medio puede disminuir la actividad del herbicida lo cual podría extrapolarse a una situación in vivo que igualmente analizó.

En dicho análisis in vivo una concentración de 0.25-0.35 mM de MV satura la fotooxidación de P700 derivando en el estudio de formación de NADPH para saber el transporte en este intervalo. El análisis ejercido mediante flashes señala que la formación de NADPH es débilmente inhibida bajo concentraciones submilimolares y alguna afección es notable solo después de que existe un posible daño por EROs. Contrariamente bajo luz continua el efecto es visible dentro los primeros 15-20 ms donde tal inhibición no es por falta de sustratos terminales, más bien es probable que el múltiple recambio del PSI permita la acumulación de reductores en el estroma (Fa/Fb y Fdred) los cuales no son consumidos rápidamente por FNR/NADP. Sin embargo al final se declara que MV es un pobre inhibidor del flujo electrónico linear, aunque como previamente se cito las variaciones en los taxa permite obtener resultados diferentes como se discutiera respecto a *S. quadricauda* en la sección de crecimiento.

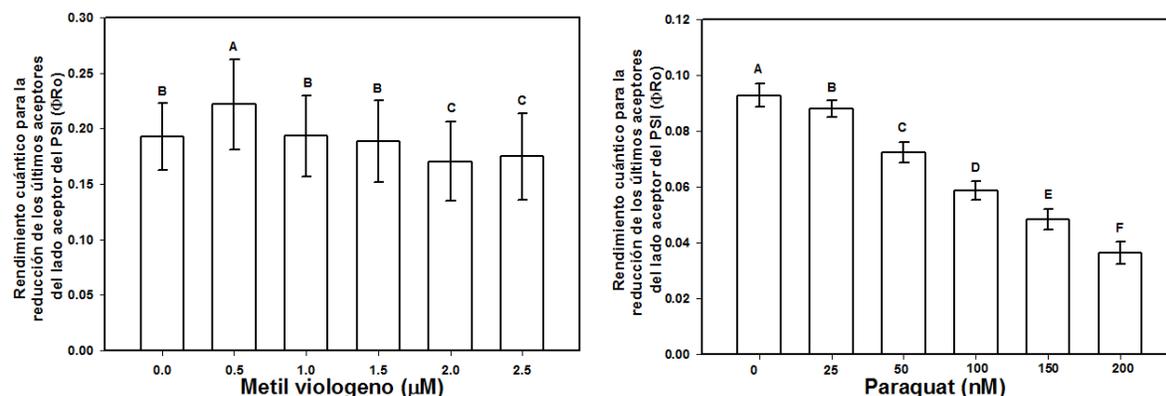


Figura 34. Efecto de las concentraciones de MV y PQ en el rendimiento cuántico para la reducción de los últimos acarreadores del lado aceptor del PSI ΦRo en *C. vulgaris* tras 72 hrs de exposición (Las letras indican diferencias significativas según la prueba de Tukey p<0.05).

Entre otros factores que podrían limitar el transporte a los últimos acarreadores del lado aceptor del PSI es la destrucción de este complejo debido al estrés inducido por paraquat. Choi y colaboradores (2001) analizan el efecto del herbicida sobre discos de hoja de pepino en comparación al daño fotoinhibitorio por enfriamiento moderado pues se sabe que este se

relaciona mas con daños al PSI. El efecto de 10 μM de MV redujo consigo el valor de ΦPSII , ETR y la liberación fotosintética de O_2 , pero la reducción de Q_A y el nivel de NPQ no fueron afectados de manera significativa.

Para saber si la fotoinhibición se relaciona con PSI o PSII se estimo el valor de F_V/F_M encontrando una baja inhibición en este parámetro (4.5%), donde la cantidad de P700 oxidado disminuyó en mayor medida en el mismo intervalo (33%) indicando que el PSI es mayormente afectado por el MV. Estos efectos se acompañaron del aumento en la inactividad de SOD Cu/Zn y APX al contrario al estrés por enfriamiento que no generó cambios a este nivel. Ambos hallazgos se relacionan de modo que la falta de mecanismos de protección siendo principalmente APX y SOD los más cercanos a la región del PSI, fueran inactivados fomentando reacciones que producen especies reactivas como el radical hidroxil que es mas reactivo que superoxido y peróxido dañando preferencialmente al PSI sobre el PSII.

V. Índice de rendimiento total

Esta estimación se conforma de cuatro expresiones que son sensibles a cambios a nivel de las antenas (RC/ABS), al rendimiento del atrapamiento energético ($\Phi PO(1-\Phi PO)$), al transporte electrónico después del primer aceptor del PSII ($\Psi O/1-\Psi O$) y a la reducción de los últimos acareadores del PSI ($\Phi Ro/1-\Phi Ro$), permitiendo evaluar en conjunto la actividad general de la cadena fotosintética de transporte de electrones.

La figura 35 muestra que este índice de rendimiento total (P_{total}) se comporta de manera distinta con cada compuesto pero evidenciando que el transporte electrónico en toda la cadena es fuertemente suprimido con el aumento de la concentración de cualquiera de los dos. Con MV se causó una máxima reducción en el rendimiento del 94.10% aplicando 2.0 μM , mientras que con PQ la máxima inhibición fue del 80.88% con una concentración de 150 nM.

Dado que este índice depende de muchas variables es posible que el producto de los estimadores de MV aumentara en mayor medida al relacionarse entre sí que los homólogos obtenidos con PQ, el cual en la mayoría de los parámetros de fluorescencia y flujos energéticos tuviera mayor impacto.

El ligero aumento en el índice de rendimiento total obtenido con la menor concentración aplicada de PQ (23.18%) puede ser adjudicado a que ocasionalmente pequeñas concentraciones pueden llegar a estimular la actividad de diferentes organismos (Miyoshi *et al.*, 2003; Prado *et al.*, 2009; Calderón-Rodríguez y Serpa-Ibañez, 2003). Sin embargo en este caso pese a que el índice de rendimiento total señale que la fotosíntesis o el transporte electrónico mejora, los resultados de crecimiento, respiración y actividad fotosintética por fluorescencia muestran graves daños en el rendimiento metabólico de *C. vulgaris*.

En comparación a estos resultados el índice de rendimiento de la absorción (IP_{abs}) reportado por Eullafroy (2009) sufrió una disminución del 30% con 10 μg de PQ y del 99% bajo 100 μg además de fuertes cambios en las fuerzas motrices para la fotosíntesis.

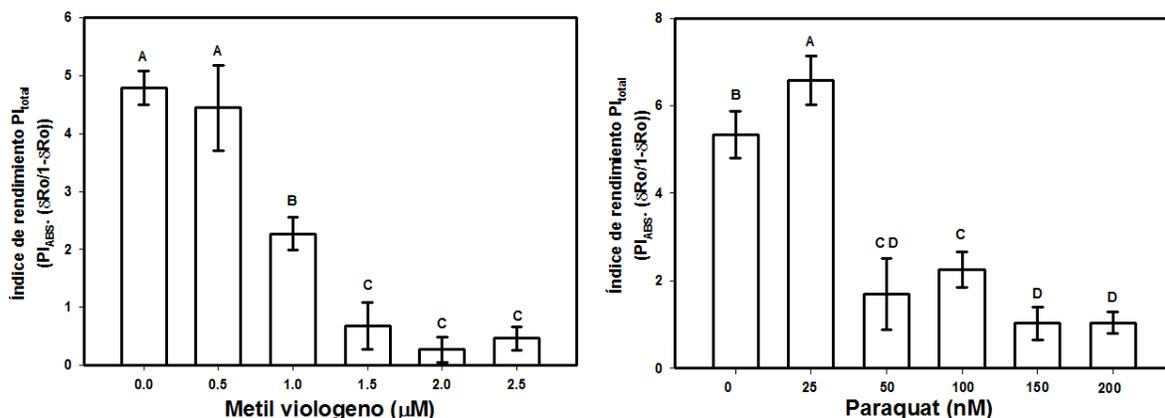


Figura 35. Efecto de las concentraciones en el índice de rendimiento total (P_{total}) de *C. vulgaris* tras 72 h de exposición (Las letras indican diferencias significativas según la prueba de Tukey $p < 0.05$).

7. Conclusiones

El efecto que puede generar el herbicida paraquat como mezcla comercial (PQ) y compuesto puro (MV) fue analizado utilizando a *C. vulgaris* como organismo de prueba representando a especies no objetivo, encontrando que cada compuesto tiene diferente nivel de toxicidad.

Ambos compuestos afectaron significativamente los parámetros de crecimiento estudiados presentando tendencias similares, sin embargo se puede concluir que PQ es mucho más dañino debido a que la concentración de ingrediente activo en el medio utilizada es hasta 20 veces menor para tener los mismos efectos que con las concentraciones de MV. Como se ha reportado por muchas investigaciones, posiblemente los daños por estrés oxidante, la lipoperoxidación de las membranas, errores en la transcripción de genes involucrados en la fotosíntesis y la presencia de los aditivos (cuyas identidades se desconocen en el caso de PQ) fueron factores determinantes que explican la reducción del crecimiento, aumento poblacional y obtención de biomasa en ésta investigación.

En los pigmentos fotosintéticos igualmente se encontró disminución donde comparativamente PQ tuvo mayor efecto en el contenido de clorofilas y MV en carotenoides, sin embargo PQ tuvo una brecha más grande entre la concentración de clorofilas y carotenoides lo cual pudo repercutir en los datos obtenidos en el análisis de la emisión de fluorescencia de la clorofila *a* con relación al decaimiento no fotoquímico. La reducción en la respiración como liberación de oxígeno puede relacionarse con los eventos que desencadena la molécula de paraquat bombeando los electrones rápidamente en la cadena de transporte fotosintética sin dar opción a la concomitante liberación de oxígeno e igualmente por la dependencia catalítica del herbicida por este mismo recurso para generar toxicidad y que se modifica por el nivel de intensidad lumínica y de concentración del pesticida.

Los datos obtenidos del análisis de fluorescencia de la clorofila *a* indican que ambos compuestos provocan la reducción de la eficiencia de la transferencia de la energía de excitación desde el LHCII hasta el PSII RC (F_V'/F_M') así como el transporte electrónico aparente (ETR) probablemente por la desactivación de la cadena de transporte de electrones por una alta concentración de H_2O_2 y que ambos parámetros demuestran señales de fotoinhibición debido a paraquat. Esta energía que no es aprovechada se refleja en los niveles de NPQ obtenidos con cada compuesto, ya que con MV el aumento de este valor fue agravándose con mayor uniformidad mientras que PQ provocó que la disipación no tuviera un patrón predecible y posiblemente este fenómeno se liga con el gradiente de protones transtilacoidal (ΔpH), componente importante de NPQ así como la disponibilidad de agentes reductores (NADPH) para el correcto funcionamiento del ciclo de las xantofilas.

El estudio de la fase rápida de la curva de inducción de fluorescencia de la clorofila *a* del PSII presentó reducciones en Ψ_0 , Φ_{PO} y por consiguiente en Φ_{EO} , relacionándose a la reducción en la probabilidad de llevar electrones después de Q_A y en el rendimiento máximo para el transporte fotosintético, afectando el rendimiento cuántico para la fotoquímica evidenciando procesos de fotoinhibición. El Paraquat provoca la sobre reducción de Q_A por una limitante en el transporte

hasta Q_b que igualmente propició la oxidación del pool de plastoquinona, evento respaldado por la gradual inhibición de la fase J en la cinética de fluorescencia conforme aumenta la concentración de MV y PQ. El secuestro de electrones por el herbicida se evidenció con el aumento del flujo electrónico en la región I-P donde los electrones posteriormente no llegan a los últimos acarreadores para la generación de NADPH por el transporte de electrones lineal, respaldado por los datos de δR_o y ΦR_o que indican que los electrones llegan a los acarreadores del lado aceptor del PSI pero no reducen a los últimos aceptores.

8. Bibliografía

- Aggrawal, A. 2006. Chapter 10: Agrochemical Poisoning. En Tsokos M. (Ed), *Forensic Pathology Reviews*, Vol. 4 (pp. 261-327). Totowa New Jersey: Humana Press.
- Ait, D., Socías, M. M., Ureña, M., Derdour, A., González, E. and Debbagh, N. 2013. Removal of paraquat from water by an Algerian bentonite. *Applied Clay Science* 83-84: 441-448.
- Albert, L. A. 2005. Panorama de los plaguicidas en México. *RETEL Revista de toxicología en línea*, Carta al editor. Recuperado de <http://www.sertox.com.ar/retel/default.htm>
- Amondham, W., Parkpian, P., Polprasert, C., Delaune, R.D., Jugsujinda, A. 2006. Paraquat adsorption, degradation, and remobilization in tropical soils of Thailand. *Journal of Environmental Science and Health Part B: pesticides, Food Contaminants, and Agricultural Wastes* 41 (5): 485-507
- Arnab, D., Rituparna, B., Ajeet, K. and Subho, M. 2014. *Springer Briefs in Molecular Science, Targeted delivery of pesticides using biodegradable polymeric nanoparticles*. New Delhi, India: Springer Science+Bussines.
- Augustyniak, M., Nocon, L., Kedzioriski, A., Laszczyca, P., Sawczyn, T., Zawisza-Raszka, A. and Tarnawska, M. 2015. DNA damage in grasshopper *Chorthippus brunneus* (Orthoptera) hatchlings following paraquat exposure. *Chemosphere*, 125: 212-219.
- Baltazar, M. T., Dinis-Oliveira, R. J., Martins, A., Bastos, M. de L., Duarte, J. A., Guilhermino, L. and Carvalho, F. 2014. Lysine acetylsalicylate increases the safety of paraquat formulation to freshwater primary producers: A case of study with the microalgae *Chlorella vulgaris*. *Aquatic Toxicology* 146: 137-143
- Bateman, D. N. 2008. New formulations of paraquat: A step forward but in the wrong direction? *PLoS Med* 5(2): e58.
- Benina, M., Mendes, D., Gechev, T., Mueller-Roeber, B. and Schippers, J. H. M. 2015. A cell type-specific view on the translation of mRNAs from ROS-responsive genes upon paraquat treatment of *Arabidopsis thaliana* leaves. *Plant, Cell and Environment*, 38: 349-363.
- Benijts-Claus, C. y Persoone, G. 1975. The influence of the formulation of the herbicide paraquat on its toxicity for aquatic organisms. *International Symposium on Crop Protection*, 1161-1173.
- Bland, P. D. and Brian, R.C. 1972. The movement of paraquat as influenced by the partition coefficient of surfactants between water and leaf wax. *Pesticide Science*, 3: 133-137.
- Boivin, A., Amellal, S., Schiavon, M. and Van Genuchten, M.T. 2005. 2,4-D sorption and degradation dynamics in three agricultural soils. *Environmental Pollution*, 138(1):92-99.
- Bolognesi, C. and Merlo, F. M. 2011. Pesticides: Human Health Effects. In: Nriagu, J.O. (Ed.), *Encyclopedia of Environmental Health* (pp. 438-453) Burlington, Elsevier.
- Bonilla, S., Conde, D. and Blanck, H. 1998. The photosynthetic response of marine phytoplankton, periphyton and epiphyton to the herbicides paraquat and simazine. *Ecotoxicology* 7: 99-105.

- Borowitzka, M. A. and Borowitzka, L. J. 1998. Microalgal biotechnology. Cambridge University Press. New York.
- Bromilow, R. H. 2003. Paraquat and sustainable agriculture. *Pest Management Science*. 60: 340-349.
- Bustamante-Perez, G. I. 2007. "Los plaguicidas y su impacto en el ambiente". Tesis (Químico Farmacéutico Biólogo). Universidad Nacional Autónoma de México, Facultad de Química. México D.F. 58 p.
- Calderón-Rodríguez, A. y Serpa-Ibañez, R. F. 2003. Efectos del paraquat sobre el crecimiento y la morfología de la microalga *Dunaliella tertiolecta*. *Ecología Aplicada*, 2(1): 1-5
- Cartaxo, M. A. M., Borges, C. M., Pereira, M. I. S. and Mendonça, M. H. 2015. Electrochemical oxidation of paraquat in neutral médium. *Electrochemical Acta* 176: 1010-1018.
- Castro, M. J. L., Ojeda, C. and Cirelli, A. F. 2013. Chapter 7: Surfactants in Agriculture. En: Lichtfouse E. *et. al* (Eds.), *Green Materials for Energy, Products and Depollution* (pp. 287-334), Dordrecht, Springer Science+Business Media.
- Chagas, R. M., Silveira, J. A. G., Ribeiro, R. V., Vitorello, V. A. and Carrer H. 2008. Photochemical damage and comparative performance of superoxide dismutase and ascorbate peroxidase in sugarcane leaves exposed to paraquat-induced oxidative stress. *Pesticide Biochemistry & Physiology*, 90:181-188.
- Choi, C. J., Berges, J. A. and Young, E. B. 2012. Rapid effects of diverse toxic water pollutants on chlorophyll a fluorescence: Variable responses among freshwater microalgae. *Water Research* 46: 2615-2626.
- Choi, S. M., Suh, K.H., Kim, J. S. and Park, Y. 2001. Inactivation of photosystem I in cucumber leaves exposed to paraquat-induced oxidative stress. *Journal of Photoscience*, 8: 13-17
- Coman, G., Farcas, A., Matei, A. V. and Florian, C. 2013. Chapter 16: pesticide mechanisms of action in living organisms En Simenov L. I. *et al.* (Eds.). *Environmental Security Assessment and Management of Obsolete Pesticides in Southeast Europe* (pp. 173-184). Dordrecht, Springer Science+Business Media.
- Cox, C. and Sorgan, M. 2006. Unidentified inert ingredients in pesticides: implications for human and environment health. *Environmental Health Perspectives* 14 (12): 4.
- Dayan, F. E. and Zaccaro, M. L. de M. 2012. Chlorophyll fluorescence as a marker for herbicide mechanisms of action. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 102: 189-197.
- Deloitte. 2013. The economic impact of paraquat. Syngenta Australia Pty Ltd.
- Dinis-Oliveira, R. J. 2007. "Research into the mechanisms of paraquat-induced multiple organ failure Development and application of antidotes and antidotal pathways for the treatment of human poisonings". Tesis (Doctorado de Filosofía en Toxicología) Universidad de Porto, Facultad de Farmacia. Porto, Brazil. 295 p.
- Duke, S.O. and Dayan, F.E. 2011. Bioactivity of Herbicides. En: Moo-Young, Murray (Ed.). *Comprehensive Biotechnology*. 2nd edition. Volume 4 (pp. 23-35). Amsterdam. Elsevier Press.
- Ekmekci, Y. and Terzioglu, S. 2005. Effects of oxidative stress induced by paraquat on wild and cultivated wheats. *Pesticide Biochemistry and Physiology* 83: 69-91

- Espindola-Santos, G. 1999. "El uso de herbicidas en el control de plantas estupefacientes en México". Tesis (Título en Ingeniería Agrícola). Universidad Nacional Autónoma de México, Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán, Estado de México, México, 60 p.
- Eullaffroy, P., Frnakart, C., and Biagianti, S. 2007. Toxic effects assessment of pollutant mixtures in *Lemna minor* using polyphasic fluorescence kinetics. *Toxicological and Environmental Chemistry*, 89 (4): 683-696.
- Eullaffroy, P., Frnakart, C., Aziz, A., Couderchet, M. and Blaise, C. 2009. Energy fluxes and driving forces for photosynthesis in *Lemna minor* exposed to herbicides. *Aquatic Botany*, 90: 172-178.
- FAO.2006. Paraquat Dichloride. *FAO Specifications and Evaluations for Agricultural Pesticides*. Food and Agriculture Organization of The United Nations.
- Farahi, A., Achak, M., El Gaini, L., El Mhammedi, M. A. and Bakasse, M. 2015. Electrochemical determination of paraquat in citric fruit based on electrodeposition of silver particles onto carbon paste electrode. *Journal of Food and Drug Analysis*, 23: 463-471.
- Ferrer, A. 2003. Intoxicacion por plaguicidas. ANALES Sis San Navarra, 26 (Supl.I): 155-171.
- Fischer, B. B., Rüfenacht, K., Dennenhauer, K., Wiesendanger, M. and Eggen R. I. L. 2010. Multiple stressor effects of light irradiance and photosynthetic herbicides on growth and survival of the green alga *Chlamydomonas reinhardtii*. *Environmental Toxicology and Chemistry*. 29 (10): 2211-2219.
- Frankart, C., Eullaffroy, P. and Vernet, G. 2003. Comparative effects of four herbicides on non-photochemical fluorescence quenching in *Lemna minor*. *Environmental and Experimental Botany* 49: 159-169.
- Frank, P. A. & Comes, R. D. 1967. Herbicidal residues in pond water and hydrosol. *Weeds* 15 (3): 210-213.
- Franqueira, D., Cid, A., Torres, E., Orosa, M. and Herrero, C. 1999. A comparison of the relative sensitivity of structural and functional cellular responses in the alga *Chlamydomonas eugametos* exposed to the herbicide Paraquat. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 36: 264-269.
- Force, L., Critchley, C., van Rensen, J. J. S. 2003. New fluorescence parameters for monitoring photosynthesis in plants. *Photosynthesis Res.*, 78: 17-33.
- Fuerst, E. F. and Norman, M. A. 1991. Interaction of herbicides with photosynthetic electron transport. *Weed Science* 39 (3): 458-464.
- Funderbunk, H. H. and Lawrence, J. M. 1964. Mode of action and metabolism of diquat and paraquat. *Weeds* 12 (4): 259-264.
- Fujii, T., Yokoyama, E., Inoue, K. and Sakurai, H. 1990. The sites of electron donation of photosystem I to methyl viologen. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1015: 41-48.
- García-Gutiérrez, C y Rodríguez-Meza, G. D. 2012. Problemática y riesgo ambiental por el uso de plaguicidas en Sinaloa. *Ra Ximhai*, 8 (3b): 1-10.
- Gerzerino, C., Quemeneur, A., Hillenweck, A., Baradat, M., Delous, G., Ollitrault, M., Azam, D., Caquet, T. and Lagadic, L. 2009. Effects of diquat and fomesafen applied alone and in combination with a

nonylphenol polyethoxylate adjuvant on *Lemna minor* in aquatic indoor microcosms. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 72: 802-810

- Gómez-Arroyo, S., Martínez-Valenzuela, C., Villalobos-Pietrini, R. and Waliszewski, S. 2011. Pesticides: Genotoxic risk of occupational exposure. En Stoytcheva, M. (Ed.), *Pesticides, The impact of pesticides exposure* (pp. 303-340). México, Intech.
- Gomez-Rojas, M. de J. 1990. "El control de los plantíos ilícitos en México". Tesis (Título en Ingeniería Agrícola)Universidad Nacional Autónoma de México, Facultad de Estudios Superiores Cuautitlan. Estado de México, México, 72 p.
- Gou, Z., Huang, M., Lu, S., Yaqing, Z. and Zhong, Q. 2007. Differential responses to paraquat induced oxidative stress in two rice cultivars on antioxidants and chlorophyll a fluorescence. *Acta Physiol. Plant.* 29:39-46.
- Goudarzi, F., Armandeh, J., Jamali, K., Rahmati, H., Meisami, A. and Abbasi, H. 2014. Mortality analysis of patients with paraquat poisoning treated at two university hospitals in Shiraz, Iran. *Asia Pacific Journal of Medical Toxicology* 3 (4): 5p.
- Gupta, P. K. 2014. Chapter 24: Herbicides and Fungicides En Gupta, R. C. (Ed.) *Biomarkers in Toxicology* (pp. 409-431) Chennai, India. Elsevier.
- Hansen, A. M., Treviño-Quintanilla, L. G., Marquez-Pacheco, H., Villada-Canela, M., González-Márquez, L.C., Guillén-Garcés, R. A. y Hernández-Antonio, A. 2013. Atrazina: Un herbicida polémico. *Rev. Int. Contam. Ambie.* 29: 65-84.
- Hassan, H. M. 1984. Exacerbation of superoxide radical formation by paraquat. *Methods in Enzimology* 105: 623-632.
- He, H.W., Peng, H. and Tan, X. S. 2014. Chapter 1: Overview En environmentally friendly alkylphosphonate herbicides En He, et al. (Eds.) *Chemical Industry Press* (pp. 1-43). Berlin, Hiedelberg. Beijing and Springer-Verlag.
- Hernández, A. y Hansen A. M. 2011. Uso de plaguicidas en dos zonas agrícolas de México y evaluación de la contaminación de agua y sedimentos. *Rev. Int. Contam. Ambie* 27 (2): 115-127.
- Hernández, H.N.A. y Martínez, A.M. 2000. Intoxicación por paraquat. *Salud en Tabasco* 6 (1): 302-305.
- Hernández, J., Contreras, E. y Zuluaga, S. X. 2008. Intoxicación por paraquat: descripción de un caso clínico. *Acta Toxicológica Argentina* 16: 5-8.
- Hiderg, E. and Schreiber, U. 2007. Parallel assessment of ROS formation and photosynthesis in leaves by fluorescence imaging. *Photosynth Res* 92 :103-108.
- Holst, R. W., Yopp, J. H. and Kapusta, G. 1982. Effect of several pesticides on the growth and nitrogen assimilation of the *Azolla-Anabaenna* symbiosis. *Weed Science* 30 (1): 54-58.
- Hough, P. 2014. The trading and use of agrochemicals. En Campbell, W. B.& López-Ortiz, S. (eds.) *Sustainable food protection includes human and environmental health* (pp. 1-41). Dordrecht, The Netherlands, Springer+Business Media.

- Ibrahim, E. A. 1990. The influence of the herbicide paraquat "gramoxon" on growth and metabolic activity of three chlorophytes. *Water, Air and Soil Pollution* 51: 89-93
- Imai, Y. & Kawatsuka S. 1989. Characteristics of paraquat-degrading microbes. *J. Pesticide Sci.* 14: 475-480.
- Isering, R. 2006. Paraquat, riesgos inaceptables para la salud de los usuarios. En Medely, J. (Ed.). *Red de Acción contras Plaguicidas-América Latina* (pp. 95) Costa Rica, Pesticide Action Network.
- Iturbe-Ormaetxe, I., Escudero, P., Arres-Igor, C. and Becana M. 1998. Oxidative damage in pea plants exposed to water deficit or paraquat. *Plant Physiology* 116: 173-181.
- Jamers, A, and De Coen, W. 2010. Effect assessment of the herbicide paraquat on a green alga using differential gene expression and biochemical biomarkers. *Environmental Toxicology and Chemistry* .29 (4): 893-901.
- Jordan, L. S., Murashige, J., Mann, J. D. and Day, B. E.:1966. Effect of photosynthesis-inhibiting herbicides on non-photosynthetic tobacco callus tissue. *Weeds* 14 (2): 134-136.
- Katayama, A. and Kuwatsuka, S. 1992. Microflora in soils with long-term applications of paraquat. *J. Pesticide Sci.* 17: 137-139.
- Kato, S. 1972. Studies on electron transport associated with photosystem I. *Biochimica et Biophysica Acta*, BBA 46415: 293-301.
- Kearney, P. C. 1975. Environmental problems of pesticides. *J. Pesticide Sci. Inaugural issue*, 43-47.
- Kirticara, K. and Talbot, D. 1996. Alteration in protein accumulation, gene expression and ascorbate-glutathione pathway in tomato (*Lycopersicon esculentum*) under paraquat and ozone stress. *J. Plant Physiol*, 148: 752-760.
- Kotabová, E., Kaňa, R., Kyseláková, H., Lípová, L., Novák, O. and Ilík P. 2008. A pronounced light-induced zeaxanthin formation accompanied by an unusually slight increase in non photochemical quenching: A study with barley leaves treated with methyl viologen at moderate light. *Journal of Plant Physiology*. 165: 1563-1571.
- Kumar, K. S., Dahms, H., Lee, J. S., Kim, H. C., Lee, W. C. and Shin, K. H. 2014. Algal photosynthetic responses to toxic metals and herbicides assessed by Chlorophyll *a* fluorescence. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 104: 51-71.
- Kupper, H., Kupper, F. and Spiller, M. 1996. Environmental relevance of heavy metal-substituted chlorophylls using the example of water plants. *Journal of Experimental Botany* 47: 259-266.
- Landrigan, P. J., Powell, K. E., James L. M. and Taylor P.R. 1983. Paraquat and marijuana: Epidemiologic Risk assessment. *American Journal of Public Health* 73 (7): 784-788.
- Lebaron, H. M. 1990. Distribution and seriousness of herbicide resistant weed infestations worldwide. *New Technology and Basic Research*, Ciba-Geigy Corporation. 17 p.
- Leboulanger, C., Bouvy, M., Carré, C., Cecchi, P., Amalric, L., Bouchez, A., Pagano, M. and Sarazin, G. 2011. Comparison of the effects of two herbicides and an insecticide on tropical freshwater plankton in microcosms. *Arch. Environ. Contam. Toxicol* 61: 599-613.

- Lebrecht, T. and Meienberg, F. 2014. More growth than good: a closer look at Syngenta's good growth plan. En Graber, M. (Ed.).The Berne Declaration 24p.
- Liu, B. Y., Nie, X. P., Liu, W. Q., Snoeijs, P., Guan, C., and Tsui, M. T. K. (2011). Toxic effects of erythromycin, ciprofloxacin and sulfamethoxazole on photosynthetic apparatus in *Selenastrum capricornutum*. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 74: 1027-1035.
- Ma, J., Xu, L. and Wang, S. 2002. A quick, simple, and accurate method of screening herbicide activity using green algae cell suspension cultures. *Weed Science* 50: 555-559.
- Madeley, J. 2003. Paraquat el controvertido herbicida de Syngenta. *Informe para la declaración de Berna, Swedich Society for Nature Conservation*. Pesticide Action Network UK, Pesticide Action Network Asia Pacific, Foro Emaús y RAP-AL Amerrique, Costa Rica, 27 p.
- Magnus, B., Lampman, R. L. and Metcalf, R. L. 1985. Model ecosystem studies of the environmental fate of five herbicides used in conservation tillage. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 14: 693-704.
- Manno, M. 1996. Chapter 21: Herbicides En Descotes, J. (Ed.), *Human toxicology* (pp. 551-560). Elsevier Science B.V.
- Martínez, C., Ortega, L. D., Mora, A., Calvo, M. S., Robles L y Gaytan J. C. 2012. Generalidades de los plaguicidas y efectos en la salud humana En: *Recursos naturales y sistemas productivos* (pp. 57-72). 1ª ed. Universidad Autónoma Indígena de México, Universidad de Occidente. México,
- Martínez-Valenzuela, C. y Gómez-Arroyo, S. 2007. Riesgo genotóxico por exposición a plaguicidas en trabajadores agrícolas. *Rev. Int. Contam. Ambient.* 23: 185-200.
- Maxwell, K. and Johnson, G. N. 2000. Chlorophyll fluorescence: a practical guide. *Journal of Experimental Botany* 51: 659-668.
- Mbuk, R.O., Sha'Ato, R., N. N. Nkpa. 2009. The role of paraquat and glyphosate in translocation of metal ions to subsurface soils. *Pak. J. Anal. Environ. Chem.* 10: 19-24.
- McKinlay, K. S., Ashford, R. and Ford, R. J. 1974. Effects of drop size, spray volume and dosage on paraquat toxicity. *Weed Science* 22 (1): 31-34.
- Miyoshi, N., Kawano, T., Tanaka, M., Kadono, T., Kosaka, T., Kunimoto, M., Takahashi, T. and Hosoya, H. 2003. Use of *Paramecium* species in bioassays for environmental risk management: determination of IC₅₀ values for water pollutants. *Journal of Health Science*,.49 (6): 429-435.
- Moctezuma, E., Leyva, E., Monreal, E., Villegas, N. and Infante D. 1999. Photocatalytic degradation of the herbicide "paraquat". *Chemosphere* 39 (3): 511-517.
- Mohammadi-Bardbori, A and Ghazi-Khanzari, M. 2008. Alternative electron acceptors: Proposed mechanism of paraquat mitochondrial toxicity. *Environmental Toxicology and Pharmacology* 26: 1-5.
- Mullineaux, C. W. and Allen J. F. 1990. State 1-State-2 transition in the cyanobacterium *Synechococcus* 6301 are controlled by the redox state of electron carriers between PhotosystemI and II. *Photosynthesis Research* 23: 297-311.

- Munday, J. and Govindjee. 1969. Light-induced changes in the fluorescence yield of Chlorophyll *a* in vivo. *Biophysical Journal* 9: 21 p.
- Muñoz, P. y Ávila . S. 2005. Los efectos de un impuesto ambiental a los plaguicidas en México. *Gaceta Ecológica* 74: 43-53.
- Neuhaus, E. H. and Stitt, M. 1989. Perturbation of photosynthesis in spinach leaf discs by low concentrations of methyl viologen. *Planta* 179: 51-60.
- PAN Germany. 2003. PAN Germany Fact Sheets: Paraquat and suicide. Recuperado de www.pan-germany.org
- Perales-Vela, H. V., González-Moreno, S., Montes-Horcasitas, C. y Cañizares-Villanueva, R. O. 2007. Growth, Photosynthetic and respiratory responses to sub-lethal copper concentrations in *Scenedesmus incrassatulus* (Chlorophyceae). *Chemosphere* 67: 2271-2281.
- Peralta-Pérez, M. de R. y Volke-Sepúlveda, T. L. 2012. La defensa antioxidante en las plantas: una herramienta clave para la fitorremediación. *Revista Mexicana de Ingeniería Química* 11 (1): 75-88.
- Pérez, M. E., Couso, I. and Crespo, J. L. 2012. Carotenoid deficiency triggers autophagy in the model green alga *Chlamydomonas reinhardtii*. *Autophagy* 8 (3): 376-388.
- Pereira, L. 2014. Chapter 8: Persistent organic chemicals of emerging environmental concern En Malik, A. *et al.* (Eds.) *Environmental deterioration and human health* (pp. 163-213). Dordrecht, Holland Springer+Business Media.
- Pimentel, D. and Burgess, M. 2014. Chapter 5: environmental and economic benefits of reducing pesticide use En Pimentel, D. and Burgess, M. (Eds.) *Integrated Pest Management* (pp. 127-139). Dordrecht, The Netherlands, Springer Science+Business Media.
- Prado, R., García, R. Rioboo, C., Herrero, C., Abalde, J. and Cid, A. 2009. Comparison of the sensitivity of different toxicity test endpoints in a microalgae exposed to the herbicide paraquat. *Environment International* 35: 240-247
- Prado, R., Rioboo, C., Herrero, C. and Cid, A. 2009. The herbicide paraquat induces alterations in the elemental and biochemical composition of non-target microalgal species. *Chemosphere* 76: 1440-1444.
- Prado, R., Rioboo, C., Herrero, C. and Cid, A. 2011. Characterization of cell response in *Chlamydomonas moewusii* cultures exposed to the herbicide paraquat: Induction of chlorosis. *Aquatic Toxicology*, 102: 10-17.
- Qian, H., Chen, W., Sun, L., Jin, Y., Liu, W. and Fu, Zhengwei. 2009. Inhibitory effects of paraquat on photosynthesis and the response to oxidative stress in *Chlorella vulgaris*. *Ecotoxicology* 18: 537-54.
- Ramírez, J. A. y Lacasaña, M. 2001. Plaguicidas: Clasificación, uso, toxicología y medición de la exposición. *Arch. Prev. Riesgos Labor.* 4 (2): 67-75.
- Ranjbar, A., Pasalar, P., Sedighi, A. and Abdollahi M. 2002. Induction of oxidative stress in paraquat formulating workers. *Toxicology Letters* 131: 191-194.

- Rebello, S., Asok, A. K., Mandayoor, S. and Jisha, M. S. 2013. Chapter 5: Surfactants: Chemistry, Toxicity and Remediation. En Lichtfouse E. *et. al.* (Eds.), *Pollutant Diseases, Remediation and Recycling* (pp. 277-320) Switzerland, Springer International Publishing.
- Rolston, P.M.; Chu, A. C. P. and Fillery, R. P. 1975. Effect of paraquat on the nitrogen-fixing activity of the white clover. *New Zealand Journal of Agricultural Research* 19 (1): 47-49.
- Rodea-Palomares, I., Makowski, M., Gonzalo, S., González-Pleiter, M., Leganés, F. and Fernández-Piña, F. 2015. Effect of PFOA/PFOS pre-exposure in the toxicity of the herbicides 2,4-D, Atrazine, Diuron and Paraquat to a model aquatic photosynthetic microorganism. *Chemosphere* 139: 65-72.
- Rodriguez, E., Azevedo, R., Costa, A., Serôdio, J. and Santos, C. 2012. Chloroplast functionality assessment by flow cytometry: Case study with pea plants under Paraquat stress. *Photosynthetica* 50 (2): 197-205.
- Sabri, M. I. and Spencer P. S. 2009. Neurotoxins and their neurotoxicology. *Encyclopedia of Neuroscience* pp. 1043-1050
- Sáenz, M. E., Alberdi, J. L., Di Marzio, W. D., Accoronti, J. and Tortorelli, C. 1997. Paraquat toxicity to different green algae. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 58: 922-928.
- Sáenz, M. E., Di Marzio, W. D., Alberdi, J. L. and Tortorelli, M. C. 2001. Algal growth recovery studies after paraquat exposure. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 66: 263-268.
- Salazar, N.J. y Aldana, M. L. 2011. Herbicida glifosato: Usos, toxicidad y regulación. *BIOTecnia*, 8 (2): 23-28.
- Santos, M. S. F., Schuale, G., Alves, A. and Madeira, L. M. 2013. Absorption of herbicide paraquat on deposits from drinking water networks. *Chemical Engineering Journal*, 229: 324-333.
- Saravi, S.S.S. and Shokrzadeh, M. 2011. Chapter 1: Role of Pesticides in Human Life in the Modern Age: A Review. En Dr. Margarita Stoytcheva (Ed), *Pesticides in the Modern World, Risks and Benefits*, InTech, Recuperado de <http://www.intechopen.com/books/pesticides-in-the-modern-world-risks-and-benefits/role-of-pesticides-in-human-life-in-the-modern-age-a-review>
- Schansker, G., Toth, S. Z. and Strasser R. J. 2005. Methyl viologen and dibromothymoquinone treatments of pea leaves reveal the role of photosystem I in the Chl *a* fluorescence rise. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1706: 250-261.
- Sebiomo, A., Ogundero, V. W. and Bankole, S. A. 2012. The impact of four herbicides on soil minerals. *Research Journal of Environmental and Earth Sciences*, 4 (6): 617-624.
- Sétif, P. 2015. Electron-transfer kinetics in cyanobacterial cells: Methyl viologen is a poor inhibitor of linear electron flow. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1847: 212-222.
- Sgarbi, D., de Moraes, M. A., Beppu, M. M. and Fernandez, L. 2012. Use of Biopolymeric membranes for absorption of paraquat herbicide from water. *Water Air Soil Pollut* 223: 3093-3104.
- Siemonov, L. I., Macaev, F. and Simeonova, B.G. (Eds.). 2012. Environmental security assessment and a management of obsolete pesticides in southeast Europe. Dordrecht, Netherlands. Springer.
- Smith, L. W. ad Foy, C. L. 1967. Interactions of several Paraquat-Surfactant Mixtures. *Weeds* 15 (1): 67-72.

- Stirbet, A. y Govindjee. 2011. On the relationship between the Kautsky effect (chlorophyll a fluorescence induction) and Photosystem II: basics and applications of the OJIP fluorescence transient. *Journal of Photochemistry and Photobiology. B. Biology* 104: 236-257.
- Strasser, J. B. and Strasser, R. J. 1995. Measuring fast fluorescence transients to address environmental questions: The JIP-test. En Mathis P. (Eds.), *Photosynthesis: From light to biosphere* (pp. 977-980) p Dordrecht, Netherlands. Kluwer Academic Publisher.
- Szigeti, Z. and Lehoczki, E. 2003. A review of physiological and biochemical aspects of resistance to atrazine and paraquat in Hungarian weeds. *Pest Management Science* 59: 451-458.
- Taguchi, V. Y., Jenkins, S., Crozier, P. W. and Wang, D. T. 1998. Determination of diquat and paraquat in water by liquid chromatography-(electrospray ionization) mass spectrometry. *J. Am. Soc. Mass Spectrom* 9: 830-839.
- Tsimilli-Michael, M. and Strasser, R. J. 2008. *In vivo* assessment of stress impact on plant's variability: Applications in detecting and evaluating the beneficial role of micorrhization on host plants. En A. Varma (Ed.), *Mycorrhiza* (pp. 679-703). Heidelberg, Springer-Verlag.
- Van Heerden, P. D. R., Tsimilli-Michael, M., Krüger, G. H. J., Strasser, R. J. 2003. Dark chilling effects on soybean genotypes during vegetative development: parallel studies of CO₂ assimilation, chlorophyll a fluorescence kinetics O-J-I-P and nitrogen fixation. *Physiol. Plantarum* 117: 476-491.
- Wasseling, C., Van Wendel de Joode, B., Ruepert, C., León, C., Monge, P., Hermosillo, H. and Partanen, T. J. 2001. Paraquat in developing countries. *Int. J. Occup. Environ. Health* 7:275-286.
- Watts, M. 2011. Paraquat. *Pesticide Action Network Asia and Pacific*. 44 p.
- Way, J. M., Newman, J. F., Moore, N. W. and Knaggs, F. W. 1971. Some ecological effects of the use of Paraquat for the control of weeds in small lakes. *Journal of Applied Ecology*, 8 (2): 509-523.
- Wellburn, A. R. 1994. The spectral determination of chlorophylls a and b as well as total carotenoides, using various solvents with spectrophotometers of different resolution. *Journal of Plant Physiology* 144: 307-313.
- Wilkinson, V. and Lucas, R. L. 1969. Effects of Gramoxone W on rates of respiration of soil fungi. *Weed Res.* 9: 288-295.
- Wong, P.K. 2000. Effects of 2,4-D, glyphosate and paraquat on growth, photosynthesis and chlorophyll-a synthesis of *Scenedesmus quadricauda*. *Chemosphere* 41:177-182.
- World Health Organization. 1990. Public health impact of pesticides used in agriculture. World Health Organization. Geneva Switzerland.
- WHO. 2005. The WHO recommended classification of pesticides by hazard and guidelines to classification 2004. World Health Organization.
- Zacharia, J. T. 2011. Identity, physical and chemical properties of pesticides. En Stoytcheva, M. (Ed.) *Pesticides in the modern world-trends in pesticides analysis* (pp 1-19). Tanzania, Intech.

- Zhang, W., Liu, M., Zhang, P., Yu, F., Lu, S., Li, P. and Zhou, J. 2014. Effects of paraquat on photosynthetic pigments, antioxidant enzymes, and gene expression in *Chlorella pyrenoidosa* under mixotrophic compared with autotrophic conditions. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 67: 593-600.
- Zimdahl, R. L. 1993. Chapter 12: Properties and uses of herbicides En Zimdahl, R. L. (Ed.) *Fundamentals of weed science* (pp. 225-269). USA, Academic press.
- Zimdahl, R. 2010. Chapter 6: development of herbicides after 1945. En Zimdahl, R. (Ed.) *A History of weed science in the United States* (pp. 79-113) USA, Elsevier.

9. Apéndice

Composición del medio mineral PCG

REACTIVO	CONCENTRACIÓN FINAL EN EL MEDIO
NaNO ₃	250 mg·L ⁻¹
Ca(NO ₃) ₂ ·4H ₂ O	30 mg·L ⁻¹
K ₂ HPO ₄	40 mg·L ⁻¹
MgSO ₄ ·7H ₂ O	30 mg·L ⁻¹
NaCl	25 mg·L ⁻¹
MICROELEMENTOS	
H ₃ BO ₃	309.1 µg·L ⁻¹
MnSO ₄ ·H ₂ O	118.3 µg·L ⁻¹
ZnSO ₄ ·7H ₂ O	143.7 µg·L ⁻¹
NaMoO ₄ ·2H ₂ O	20.4 µg·L ⁻¹
Co(NO ₃) ₂ ·6H ₂ O	140.4 µg·L ⁻¹
CuSO ₄ ·5H ₂ O	156.8 µg·L ⁻¹
FeSO ₄ ·7H ₂ O	4.98 mg/L

Análisis de varianza para un diseño experimental de bloques al azar generalizados, prueba de Tukey (p=0.05). Datos analizados con prueba de distribución normal y homogeneidad de varianzas de Bartlett.

Figura 7. Crecimiento por peso seco

Sistema SAS		12:26 Thursday, May 6, 2015 235			
Procedimiento ANOVA					
Variable dependiente: MV					
Fuente	DF	Suma de cuadrados	Cuadrado de la media	F-Valor	Pr > F
Modelo	29	645828.9039	22269.9622	812.75	<.0001
Error	60	1644.0461	27.4008		
Total correcto	89	647472.9500			
	R-cuadrado	Coef Var	Raiz MSE	y Media	
	0.997461	3.511059	5.234574	149.0882	
Sistema SAS		12:26 Thursday, May 6, 2015 186			
Procedimiento ANOVA					
Variable dependiente: PQ					
Fuente	DF	Suma de cuadrados	Cuadrado de la media	F-Valor	Pr > F
Modelo	41	628111.7370	15319.7985	570.83	<.0001

Error	84	2254.3770	26.8378
Total correcto	125	630366.1140	
R-cuadrado	Coef Var	Raiz MSE	y Media
0.996424	3.694460	5.180523	140.2241

Figura 9. Tasa de crecimiento relativo

Sistema SAS 12:26 Thursday, May 6, 2015 251

Procedimiento ANOVA

Variable dependiente: MV

Fuente	DF	Suma de cuadrados	Cuadrado de la media	F-Valor	Pr > F
Modelo	29	0.00798853	0.00027547	390.31	<.0001
Error	60	0.00004235	0.00000071		
Total correcto	89	0.00803088			
R-cuadrado	Coef Var	Raiz MSE	y Media		
0.994727	2.285114	0.000840			

Sistema SAS 12:26 Thursday, May 6, 2015 152

Procedimiento ANOVA

Variable dependiente: PQ

Fuente	DF	Suma de cuadrados	Cuadrado de la media	F-Valor	Pr > F
Modelo	41	0.00693088	0.00016905	603.16	<.0001
Error	84	0.00002354	0.00000028		
Total correcto	125	0.00695442			
R-cuadrado	Coef Var	Raiz MSE	y Media		
0.996615	1.468443	0.000529	0.036052		

Figura 10. Tiempo de duplicación

Sistema SAS 12:26 Thursday, May 6, 2015 267

Procedimiento ANOVA

Variable dependiente: MV

Fuente	DF	Suma de cuadrados	Cuadrado de la media	F-Valor	Pr > F
Modelo	29	6937.321692	239.217989	467.09	<.0001
Error	60	30.728764	0.512146		
Total correcto	89	6968.050457			
R-cuadrado	Coef Var	Raiz MSE	y Media		
0.995590	3.419808	0.715644	20.92643		

Sistema SAS 12:26 Thursday, May 6, 2015 203

Procedimiento ANOVA

Variable dependiente: PQ

Fuente	DF	Suma de cuadrados	Cuadrado de la media	F-Valor	Pr > F
Modelo	41	3507.864331	85.557667	215.05	<.0001
Error	84	33.420168	0.397859		
Total correcto	125	3541.284499			
R-cuadrado	Coef Var	Raiz MSE	y Media		
0.990563	3.111357	0.630761	20.27285		

Figura 11. Concentración de clorofilas

Sistema SAS 13:04 Wednesday, October 6, 2015 46

Procedimiento ANOVA

Variable dependiente: MV

Fuente	DF	Suma de cuadrados	Cuadrado de la media	F-Valor	Pr > F
Modelo	29	404.5730341	13.9507943	760.85	<.0001
Error	60	1.1001471	0.0183358		
Total correcto	89	405.6731812			
R-cuadrado	Coef Var	Raiz MSE	y Media		
0.997288	5.199115	0.135410	2.604476		

Sistema SAS 12:26 Thursday, May 6, 2015 316

Procedimiento ANOVA

Variable dependiente: PQ

Fuente	DF	Suma de cuadrados	Cuadrado de la media	F-Valor	Pr > F
Modelo	35	514.3628696	14.6960820	66.20	<.0001
Error	72	15.9829864	0.2219859		
Total correcto	107	530.3458560			
	R-cuadrado	Coef Var	Raiz MSE	y Media	
	0.969863	16.73769	0.471154	2.814928	

Figura 13. Clorofilas por peso seco

Sistema SAS 13:54 Wednesday, September 29, 2015 34

Procedimiento ANOVA

Variable dependiente: MV

Fuente	DF	Suma de cuadrados	Cuadrado de la media	F-Valor	Pr > F
Modelo	29	10423.80402	359.44152	196.99	<.0001
Error	60	109.48124	1.82469		
Total correcto	89	10533.28526			
	R-cuadrado	Coef Var	Raiz MSE	y Media	
	0.989606	7.217183	1.350810	18.71658	

Sistema SAS 13:54 Wednesday, September 29, 2015 67

Procedimiento ANOVA

Variable dependiente: PQ

Fuente	DF	Suma de cuadrados	Cuadrado de la media	F-Valor	Pr > F
Modelo	35	8991.829710	256.909420	39.88	<.0001
Error	72	463.873530	6.442688		
Total correcto	107	9455.703240			
	R-cuadrado	Coef Var	Raiz MSE	y Media	
	0.950942	13.14131	2.538245	19.31501	

Figura 14. Concentración de carotenoides

Sistema SAS 13:04 Wednesday, October 6, 2015 30

Procedimiento ANOVA

Variable dependiente: MV

Fuente	DF	Suma de cuadrados	Cuadrado de la media	F-Valor	Pr > F
Modelo	29	11.65554459	0.40191533	328.31	<.0001
Error	60	0.07345061	0.00122418		
Total correcto	89	11.72899519			
	R-cuadrado	Coef Var	Raiz MSE	y Media	
	0.993738	6.369932	0.034988	0.549272	

Sistema SAS 12:26 Thursday, May 6, 2015 333

Procedimiento ANOVA

Variable dependiente: PQ

Fuente	DF	Suma de cuadrados	Cuadrado de la media	F-Valor	Pr > F
Modelo	35	17.28348764	0.49381393	10.72	<.0001
Error	72	3.31628943	0.04605958		
Total correcto	107	20.59977707			
	R-cuadrado	Coef Var	Raiz MSE	y Media	
	0.839013	36.40407	0.214615	0.589536	

Figura 15. Carotenoides por peso seco

Sistema SAS 13:54 Wednesday, September 29, 2015 50
 Procedimiento ANOVA

Variable dependiente: MV

Fuente	DF	Suma de cuadrados	Cuadrado de la media	F-Valor	Pr > F
Modelo	29	122.6271462	4.2285223	40.02	<.0001
Error	60	6.3398210	0.1056637		
Total correcto	89	128.9669672			
	R-cuadrado	Coef Var	Raiz MSE	y Media	
	0.950842	8.813087	0.325060	3.688373	

Sistema SAS 13:54 Wednesday, September 29, 2015 84
 Procedimiento ANOVA

Variable dependiente: PQ

Fuente	DF	Suma de cuadrados	Cuadrado de la media	F-Valor	Pr > F
Modelo	35	116.0922369	3.3169211	3.97	<.0001
Error	72	60.1076581	0.8348286		
Total correcto	107	176.1998950			
	R-cuadrado	Coef Var	Raiz MSE	y Media	
	0.658867	22.99542	0.913690	3.973355	

Figura 16. Liberación de oxígeno fotosintético

Sistema SAS 12:26 Thursday, May 6, 2015 349
 Procedimiento ANOVA

Variable dependiente: MV

Fuente	DF	Suma de cuadrados	Cuadrado de la media	F-Valor	Pr > F
Modelo	23	53833.42244	2340.58358	20.95	<.0001
Error	48	5363.82487	111.74635		
Total correcto	71	59197.24731			
	R-cuadrado	Coef Var	Raiz MSE	y Media	
	0.909391	26.08881	10.57101	40.51934	

Sistema SAS 12:26 Thursday, May 6, 2015 381
 Procedimiento ANOVA

Variable dependiente: PQ

Fuente	DF	Suma de cuadrados	Cuadrado de la media	F-Valor	Pr > F
Modelo	23	35880.78867	1560.03429	6.95	<.0001
Error	48	10771.05196	224.39692		
Total correcto	71	46651.84063			
	R-cuadrado	Coef Var	Raiz MSE	y Media	
	0.769118	44.40683	14.97988	33.73329	

Figura 17. Rendimiento fotoquímico a la luz (F_V'/F_M')

Sistema SAS 12:26 Thursday, May 6, 2015 608
 Procedimiento ANOVA

Variable dependiente: MV

Fuente	DF	Suma de cuadrados	Cuadrado de la media	F-Valor	Pr > F
Modelo	17	0.65745370	0.03867375	30.81	<.0001
Error	36	0.04518533	0.00125515		
Total correcto	53	0.70263904			
	R-cuadrado	Coef Var	Raiz MSE	y Media	
	0.935692	8.246900	0.035428	0.429593	

Sistema SAS 14:02 Saturday, October 2, 2015 14
 Procedimiento ANOVA

Variable dependiente: PQ

Fuente	DF	Suma de cuadrados	Cuadrado de la media	F-Valor	Pr > F
Modelo	23	0.63764821	0.02772384	17.48	<.0001
Error	48	0.07613667	0.00158618		
Total correcto	71	0.71378488			
	R-cuadrado	Coef Var	Raiz MSE	y Media	
	0.893334	8.771636	0.039827	0.454042	

Figura 18. Transporte electrónico aparente (ETrap)

Sistema SAS 13:48 Friday, October 1, 2015 14
Procedimiento ANOVA

Variable dependiente: MV

Fuente	DF	Suma de cuadrados	Cuadrado de la media	F-Valor	Pr > F
Modelo	17	2592.448013	152.496942	14.49	<.0001
Error	36	378.986621	10.527406		
Total correcto	53	2971.434634			
	R-cuadrado	Coef Var	Raiz MSE	y Media	
	0.872457	13.82255	3.244596	23.47320	

Sistema SAS 13:48 Friday, October 1, 2015 30
Procedimiento ANOVA

Variable dependiente: PQ

Fuente	DF	Suma de cuadrados	Cuadrado de la media	F-Valor	Pr > F
Modelo	23	2591.684454	112.681933	12.81	<.0001
Error	48	422.149406	8.794779		
Total correcto	71	3013.833860			
	R-cuadrado	Coef Var	Raiz MSE	y Media	
	0.859929	12.78603	2.965599	23.19406	

Figura 19. Relajación térmica (NPQ)

Sistema SAS 12:26 Thursday, May 6, 2015 576
Procedimiento ANOVA

Variable dependiente: MV

Fuente	DF	Suma de cuadrados	Cuadrado de la media	F-Valor	Pr > F
Modelo	17	0.26515387	0.01559729	16.88	<.0001
Error	36	0.03326933	0.00092415		
Total correcto	53	0.29842320			
	R-cuadrado	Coef Var	Raiz MSE	y Media	
	0.888516	13.29976	0.030400	0.228574	

Sistema SAS 13:04 Wednesday, October 6, 2015 124
Procedimiento ANOVA

Variable dependiente: PQ

Fuente	DF	Suma de cuadrados	Cuadrado de la media	F-Valor	Pr > F
Modelo	23	0.39767632	0.01729027	6.51	<.0001
Error	48	0.12753067	0.00265689		
Total correcto	71	0.52520699			
	R-cuadrado	Coef Var	Raiz MSE	y Media	
	0.757180	22.41223	0.051545	0.229986	

Figura 24. Fracción de complejos liberadores de oxígeno del PSII

Sistema SAS 12:35 Thursday, October 14, 2015 75
Procedimiento ANOVA

Variable dependiente: MV

Fuente	DF	Suma de cuadrados	Cuadrado de la media	F-Valor	Pr > F
Modelo	23	1.75786988	0.07642913	17.67	<.0001

Error	216	0.93432286	0.00432557
Total correcto	239	2.69219274	
	R-cuadrado	Coef Var	Raiz MSE y Media
	0.652951	6.916292	0.065769 0.950929

Sistema SAS 12:35 Thursday, October 14, 2015 95
 Procedimiento ANOVA

Variable dependiente: PQ

Fuente	DF	Suma de cuadrados	Cuadrado de la media	F-Valor	Pr > F
Modelo	29	1.50614469	0.05193602	77.76	<.0001
Error	240	0.16030616	0.00066794		
Total correcto	269	1.66645085			
	R-cuadrado	Coef Var	Raiz MSE y Media		
	0.903804	2.712043	0.025845 0.952956		

Figura 26. Centros de reacción activos por complejo antena (RC/ABS)

Sistema SAS 12:35 Thursday, October 14, 2015 17
 Procedimiento ANOVA

Variable dependiente: MV

Fuente	DF	Suma de cuadrados	Cuadrado de la media	F-Valor	Pr > F
Modelo	23	0.36707957	0.01595998	96.39	<.0001
Error	216	0.03576414	0.00016557		
Total correcto	239	0.40284371			
	R-cuadrado	Coef Var	Raiz MSE y Media		
	0.911221	5.372014	0.012868 0.239530		

Sistema SAS 12:35 Thursday, October 14, 2015 37
 Procedimiento ANOVA

Variable dependiente: PQ

Fuente	DF	Suma de cuadrados	Cuadrado de la media	F-Valor	Pr > F
Modelo	29	0.54522517	0.01880087	403.13	<.0001
Error	240	0.01119294	0.00004664		
Total correcto	269	0.55641811			
	R-cuadrado	Coef Var	Raiz MSE y Media		
	0.979884	2.631261	0.006829 0.259539		

Figura 27. Flujo absorbido por centro de reacción (ABS/RC)

Sistema SAS 12:26 Thursday, May 6, 2015 871
 Procedimiento ANOVA

Variable dependiente: MV

Fuente	DF	Suma de cuadrados	Cuadrado de la media	F-Valor	Pr > F
Modelo	23	116.7793505	5.0773631	62.52	<.0001
Error	214	17.3787793	0.0812092		
Total correcto	237	134.1581298			
	R-cuadrado	Coef Var	Raiz MSE y Media		
	0.870460	6.623254	0.284972 4.302604		

Sistema SAS 12:26 Thursday, May 6, 2015 890
 Procedimiento ANOVA

Variable dependiente: PQ

Fuente	DF	Suma de cuadrados	Cuadrado de la media	F-Valor	Pr > F
Modelo	23	187.7257845	8.1619906	503.45	<.0001
Error	216	3.5017942	0.0162120		
Total correcto	239	191.2275786			
	R-cuadrado	Coef Var	Raiz MSE y Media		

0.981688 3.129609 0.127326 4.068444
 Figura 28. Atrapamiento por centro de reacción (TR/RC)
 Sistema SAS 12:26 Thursday, May 6, 2015 909
 Procedimiento ANOVA

Variable dependiente: MV

Fuente	DF	Suma de cuadrados	Cuadrado de la media	F-Valor	Pr > F
Modelo	23	4.41667958	0.19202955	13.53	<.0001
Error	214	3.03824552	0.01419741		
Total correcto	237	7.45492510			
	R-cuadrado	Coef Var	Raiz MSE	y Media	
	0.592451	5.170274	0.119153	2.304576	

Sistema SAS 12:26 Thursday, May 6, 2015 928
 Procedimiento ANOVA

Variable dependiente: PQ

Fuente	DF	Suma de cuadrados	Cuadrado de la media	F-Valor	Pr > F
Modelo	23	5.63252190	0.24489226	102.09	<.0001
Error	216	0.51814272	0.00239881		
Total correcto	239	6.15066462			
	R-cuadrado	Coef Var	Raiz MSE	y Media	
	0.915758	2.192651	0.048978	2.233718	

Figura 29. Transporte electrónico por centro de reacción (ET/RC)
 Sistema SAS 12:26 Thursday, May 6, 2015 947
 Procedimiento ANOVA

Variable dependiente: MV

Fuente	DF	Suma de cuadrados	Cuadrado de la media	F-Valor	Pr > F
Modelo	23	13.86259111	0.60272135	113.29	<.0001
Error	214	1.13856372	0.00532039		
Total correcto	237	15.00115483			
	R-cuadrado	Coef Var	Raiz MSE	y Media	
	0.924102	11.47032	0.072941	0.635911	

Sistema SAS 12:26 Thursday, May 6, 2015 966
 Procedimiento ANOVA

Variable dependiente: PQ

Fuente	DF	Suma de cuadrados	Cuadrado de la media	F-Valor	Pr > F
Modelo	23	13.46138005	0.58527739	229.06	<.0001
Error	215	0.54936425	0.00255518		
Total correcto	238	14.01074429			
	R-cuadrado	Coef Var	Raiz MSE	y Media	
	0.960790	8.157775	0.050549	0.619640	

Figura 30. Rendimiento cuántico máximo para la fotoquímica primaria (Φ_{PO})
 Sistema SAS 12:26 Thursday, May 6, 2015 509
 Procedimiento ANOVA

Variable dependiente: MV

Fuente	DF	Suma de cuadrados	Cuadrado de la media	F-Valor	Pr > F
Modelo	23	1.38403649	0.06017550	21.37	<.0001
Error	216	0.60833553	0.00281637		
Total correcto	239	1.99237202			
	R-cuadrado	Coef Var	Raiz MSE	y Media	
	0.694668	9.770616	0.053069	0.543154	

Sistema SAS 13:49 Thursday, October 7, 2015 78

Procedimiento ANOVA

Variable dependiente: PQ

Fuente	DF	Suma de cuadrados	Cuadrado de la media	F-Valor	Pr > F
Modelo	29	1.68521641	0.05811091	758.75	<.0001
Error	240	0.01838093	0.00007659		
Total correcto	269	1.70359734			
R-cuadrado	Coef Var	Raiz MSE	y Media		
0.989211	1.537461	0.008751	0.569212		

Figura 31. Probabilidad de que un electrón atrapado se mueva más allá de Q_A (Ψ_0)
Sistema SAS 12:26 Thursday, May 6, 2015 681

Procedimiento ANOVA

Variable dependiente: MV

Fuente	DF	Suma de cuadrados	Cuadrado de la media	F-Valor	Pr > F
Modelo	23	2.67865622	0.11646331	178.73	<.0001
Error	214	0.13944456	0.00065161		
Total correcto	237	2.81810077			
R-cuadrado	Coef Var	Raiz MSE	y Media		
0.950518	9.248619	0.025527	0.276005		

Sistema SAS 13:49 Thursday, October 7, 2015 158
Procedimiento ANOVA

Variable dependiente: PQ

Fuente	DF	Suma de cuadrados	Cuadrado de la media	F-Valor	Pr > F
Modelo	9	2.76539569	0.30726619	167.21	<.0001
Error	260	0.47779103	0.00183766		
Total correcto	269	3.24318672			
R-cuadrado	Coef Var	Raiz MSE	y Media		
0.852679	14.85481	0.042868	0.288579		

Figura 32. Rendimiento cuántico máximo para el transporte electrónico del PSII (Φ_{EO})
Sistema SAS 12:26 Thursday, May 6, 2015 471

Procedimiento ANOVA

Variable dependiente: MV

Fuente	DF	Suma de cuadrados	Cuadrado de la media	F-Valor	Pr > F
Modelo	23	1.34017042	0.05826828	81.86	<.0001
Error	216	0.15375710	0.00071184		
Total correcto	239	1.49392752			
R-cuadrado	Coef Var	Raiz MSE	y Media		
0.897079	16.93441	0.026680	0.157551		

Sistema SAS 13:49 Thursday, October 7, 2015 58
Procedimiento ANOVA

Variable dependiente: PQ

Fuente	DF	Suma de cuadrados	Cuadrado de la media	F-Valor	Pr > F
Modelo	9	1.51090975	0.16787886	249.55	<.0001
Error	260	0.17490993	0.00067273		
Total correcto	269	1.68581968			
R-cuadrado	Coef Var	Raiz MSE	y Media		
0.896246	15.03416	0.025937	0.172521		

Figura 33. Probabilidad de que un electrón proveniente de los acarreadores intermedios reduzca a los acarreadores del lado aceptor del PSI (δRo)

Sistema SAS 12:35 Thursday, October 14, 2015 114

Procedimiento ANOVA

Variable dependiente: MV

Fuente	DF	Suma de cuadrados	Cuadrado de la media	F-Valor	Pr > F
Modelo	23	59.93905633	2.60604593	115.91	<.0001
Error	216	4.85638989	0.02248329		
Total correcto	239	64.79544622			
	R-cuadrado	Coef Var	Raiz MSE	y Media	
	0.925050	17.45630	0.149944	0.858969	

Sistema SAS 12:35 Thursday, October 14, 2015 134
Procedimiento ANOVA

Variable dependiente: PQ

Fuente	DF	Suma de cuadrados	Cuadrado de la media	F-Valor	Pr > F
Modelo	29	37.86178176	1.30557868	13.50	<.0001
Error	240	23.20912526	0.09670469		
Total correcto	269	61.07090703			
	R-cuadrado	Coef Var	Raiz MSE	y Media	
	0.619964	41.41489	0.310974	0.750874	

Figura 34. Rendimiento cuántico para la reducción de los últimos acarreadores del lado aceptor del PSI Φ Ro

Sistema SAS 12:35 Thursday, October 14, 2015 153
Procedimiento ANOVA

Variable dependiente: MV

Fuente	DF	Suma de cuadrados	Cuadrado de la media	F-Valor	Pr > F
Modelo	23	12.57114879	0.54657169	1498.42	<.0001
Error	216	0.07878942	0.00036477		
Total correcto	239	12.64993821			
	R-cuadrado	Coef Var	Raiz MSE	y Media	
	0.993772	10.03390	0.019099	0.190343	

Sistema SAS 12:35 Thursday, October 14, 2015 173
Procedimiento ANOVA

Variable dependiente: PQ

Fuente	DF	Suma de cuadrados	Cuadrado de la media	F-Valor	Pr > F
Modelo	29	0.26673600	0.00919779	351.89	<.0001
Error	240	0.00627321	0.00002614		
Total correcto	269	0.27300920			
	R-cuadrado	Coef Var	Raiz MSE	y Media	
	0.977022	7.734441	0.005113	0.066101	

Figura 35. Índice de rendimiento total (IP total)

Sistema SAS 12:35 Thursday, October 14, 2015 192
Procedimiento ANOVA

Variable dependiente: MV

Fuente	DF	Suma de cuadrados	Cuadrado de la media	F-Valor	Pr > F
Modelo	23	1875.998607	81.565157	40.15	<.0001
Error	216	438.830816	2.031624		
Total correcto	239	2314.829423			
	R-cuadrado	Coef Var	Raiz MSE	y Media	
	0.810426	66.24065	1.425351	2.151776	

Sistema SAS 12:35 Thursday, October 14, 2015 232
Procedimiento ANOVA

Variable dependiente: PQ

Fuente	DF	Suma de cuadrados	Cuadrado de la media	F-Valor	Pr > F
Modelo	29	3997.137142	137.832315	65.62	<.0001
Error	240	504.123416	2.100514		
Total correcto	269	4501.260558			
	R-cuadrado	Coef Var	Raiz MSE	y Media	
	0.888004	48.50020	1.449315	2.988266	

Valores brutos promediados de los parámetros medidos tras la aplicación de MV para la obtención de los porcentajes señalados en la sección de resultados y discusión.

MV (μM)	0	0.5	1	1.5	2.0	2.5
Carotenoides por peso seco	4.7154	4.2151	4.0752	3.4844	3.053	2.5272
Carotenoides totales	1.15636	0.64898	0.59165	0.37586	0.30366	0.21912
Clorofila por peso seco	28.5911	21.8745	21.3034	15.1712	13.2252	12.1341
Clorofilas totales	6.47663	2.91075	2.89949	1.40794	1.09684	0.8352
Crecimiento relativo	0.0464218	0.0393989	0.0379427	0.03482	0.0322665	0.0297335
Peso seco general	265.963	161.947	146.32	120.23	108.432	91.636
Tiempo de duplicación	15.1728	18.1613	18.8238	20.922	24.6116	27.8671
Fotosíntesis	79.463	45.508	36.366	31.206	30.268	20.304
ETR	32.379	27.397	25.975	19.266	18.56	17.263
Fv'/Fm'	0.58522	0.466	0.47933	0.35511	0.35078	0.34111
NPQ	0.17944	0.247	0.218	0.27256	0.24144	0.213
RC/ABS	0.293733	0.256225	0.247089	0.228759	0.205936	0.20548
ABS/RC	3.43056	3.97217	4.16437	4.40268	4.90997	4.91657
TRO/RC	2.21443	2.23544	2.2398	2.28258	2.4199	2.43251
ET/RC	0.8896	0.68728	0.59624	0.56823	0.57023	0.50855
ΦEO	0.256075	0.179882	0.154063	0.13073	0.11756	0.106995
ΦPO	0.63141	0.5718	0.55082	0.51123	0.49818	0.49548
ΨO	0.40474	0.303074	0.26706	0.247387	0.228165	0.205665
fracción de CLO	1	0.98593	0.98871	0.96332	0.88019	0.88743
$\delta\text{ Ro}$	0.54644	0.91055	1.03407	1.03897	0.95096	0.67283
$\Phi\text{ Ro}$	0.192774	0.221966	0.193305	0.188468	0.170599	0.174948
IP total	4.5871	4.4418	2.2588	0.6793	0.2705	0.4652

Valores brutos promediados de los parámetros medidos tras la aplicación de PQ para la obtención de los porcentajes señalados en la sección de resultados y discusión.

PQ (nM)	0	25	50	100	150	200
Carotenoides por peso seco	5.0284	4.4915	4.2775	3.4939	3.3817	3.1671
Carotenoides totales	1.20029	0.7429	0.61588	0.40833	0.30741	0.2624
Clorofila por peso seco	30.8154	23.7995	19.3732	14.5563	14.4909	12.8547
Clorofilas totales	6.9931	3.5405	2.6194	1.5276	1.2239	0.985
Crecimiento relativo	0.0446305	0.0397357	0.0374445	0.0338458	0.0313715	0.0292836
Peso seco general	234.454	168.398	143.955	112.828	95.16	86.55
Tiempo de duplicación	15.6374	17.6171	18.6874	21.1023	22.913	25.5809
Fotosíntesis	56.292	49.039	31.18	25.36	24.715	15.814
ETR	30.691	27.913	25.881	19.91	18.663	16.107
Fv'/Fm'	0.60075	0.509	0.48358	0.40475	0.38275	0.34342
NPQ	0.15917	0.29467	0.238	0.18817	0.24175	0.25817
RC/ABS	0.316032	0.291826	0.267605	0.24203	0.236012	0.20373
ABS/RC	3.23916	3.4926	3.79789	4.2146	4.3024	5.36402
TRO/RC	2.13909	2.14735	2.16556	2.25498	2.28946	2.40588
ET/RC	0.86799	0.73898	0.61376	0.53946	0.54241	0.41
ΦEO	0.274862	0.21912	0.171013	0.135124	0.135493	0.099511
ΦPO	0.666996	0.616122	0.575509	0.540082	0.536829	0.479733
ΨO	0.41168	0.354009	0.291413	0.243631	0.247	0.183742
fracción de CLO	1	1.001357	0.983936	0.94102	0.919209	0.872214
δ Ro	0.50222	0.65919	0.75994	0.87874	0.72292	0.98222
Φ Ro	0.092828	0.088075	0.072436	0.058643	0.0484	0.036226
IP total	5.343	6.5804	1.6886	2.2535	1.0217	1.0423