



UNIVERSIDADE DA CORUÑA

Facultad de Ciencias

Departamento de Biología Celular y Molecular

Área de Microbiología

Toxicidad ejercida por un antiinflamatorio no esteroideo de uso común (ibuprofeno) sobre la microalga dulceacuícola *Scenedesmus quadricauda* (Turpin) Brebisson

Toxicidade exercida por un antiinflamatorio non esteroideo de uso común (ibuprofeno) sobre a microalga doceacuícola *Scenedesmus quadricauda* (Turpin) Brebisson

Toxicity provoked by a commonly used nonsteroidal anti-inflammatory agent (ibuprofen) on the freshwater microalga *Scenedesmus quadricauda* (Turpin) Brebisson

Paula Ramos Fariña

Trabajo de Fin de Grado

29 de Junio de 2015

Dirigido por la Dra. Concepción Herrero López

El presente Trabajo de Fin de Grado ha sido realizado en el Laboratorio de Microbiología del Departamento de Biología Celular y Molecular de la Universidade da Coruña, bajo la dirección de la Dra. Concepción Herrero López, Catedrática de Microbiología de la Facultad de Ciencias de la Universidade da Coruña.

Índice

Resumen/Abstract	1
1.Introducción	3
2. Objetivo	4
3. Materiales y métodos	4
3.1 Descripción de la especie	4
3.2 Cultivo microalgal	5
3.3 Ibuprofeno	6
3.4 Determinación del crecimiento	6
3.4.1 Densidad óptica	6
3.4.2 Recuento del número de células	7
3.4.3 Tasa de crecimiento	7
3.5 Determinación de la IC ₅₀	7
3.6 Determinación espectrofotométrica de pigmentos	7
3.7 Análisis de la actividad celular	8
3.8 Análisis estadístico	9
3.9 Diseño experimental	9
4. Resultados y discusión	10
4.1 Experimento 1	10
4.2 Experimento 2	11
4.3 Experimento 3	12
4.3.1 Crecimiento	12
4.3.2 Pigmentos	15
4.3.3 Actividad celular	18
4.3.4 Alteraciones morfológicas	19
5. Conclusiones/Conclusions	20
6. Bibliografía	21

Resumen

Los contaminantes emergentes, entre los que se encuentran los productos farmacéuticos, son una preocupación creciente debido a su posible efecto tóxico sobre la biota acuática, especialmente sobre las microalgas, ya que son productores primarios de los medios acuáticos y esenciales en el reciclado de nutrientes y en el mantenimiento del balance de oxígeno.

El fármaco antiinflamatorio ibuprofeno es uno de los medicamentos más utilizados en el mundo, por lo que es importante evaluar su potencial toxicidad.

En este trabajo se estudió el efecto tóxico del ibuprofeno sobre la microalga dulceacuícola *Scenedesmus quadricauda*. Concretamente, sobre el crecimiento, la actividad celular medida como actividad esterasa y el contenido en pigmentos fotosintéticos. Se utilizaron diferentes concentraciones de ibuprofeno, tomando como control cultivos sin el fármaco.

El crecimiento se redujo significativamente ($p < 0.05$) al aumentar la concentración de ibuprofeno, excepto en los cultivos con menor concentración del mismo. El contenido en pigmentos y la actividad celular también se redujeron significativamente al aumentar la concentración del fármaco. Asimismo, se observaron alteraciones morfológicas en las células afectadas por el ibuprofeno, que pasaron a estar aisladas, con formas más redondeadas y menor coloración verde debido a la disminución del contenido en pigmentos.

Palabras clave: ibuprofeno, microalga dulceacuícola, *Scenedesmus quadricauda*, toxicidad

Summary

Emerging pollutants as pharmaceuticals are a growing concern due to their potential toxic effects on aquatic biota, specially on microalgae, because they are primary producers of aquatic ecosystems and essential for the recycling of nutrients and the maintenance of oxygen balance.

The anti-inflammatory drug ibuprofen is one of the most used medicines in the world, so it is important to assess its potential toxicity.

In this work, the toxic effect of ibuprofen on the freshwater microalga *Scenedesmus quadricauda* was studied. Parameters assessed were cellular growth, cellular activity (measured as esterase activity) and photosynthetic pigments content. Different concentrations of ibuprofen were assayed, and cultures without drug were included as control.

Growth was significantly reduced ($p < 0.05$) when the concentration of ibuprofen increased, except for the lower concentrations assayed. Pigments content and cellular activity were also significantly reduced with increasing drug concentration. Likewise, morphological alterations were observed in cells affected by ibuprofen, which appeared isolated, with round shape and bleached due to the decrease in pigments content with the highest concentrations of ibuprofen.

Keywords: ibuprofen, freshwater microalga, *Scenedesmus quadricauda*, toxicity

1. Introducción

Los contaminantes emergentes son compuestos de distinto origen y naturaleza química, de los cuales existe información limitada. No están cubiertos por los reglamentos de calidad de agua existentes actualmente, y se cree que pueden ser amenazas potenciales para los ecosistemas y para la salud y seguridad humana (Farré *et al.*, 2008). Entre ellos se encuentran los productos farmacéuticos, de cuidado personal, esteroides, hormonas, compuestos perfluorados, agentes tensoactivos o aditivos industriales, entre otros (Farré *et al.*, 2008). La característica principal de estos grupos de contaminantes es que no necesitan estar constantemente en el ambiente para causar efectos negativos, puesto que sus altas tasas de transformación y/o eliminación se pueden compensar por su continua introducción en el mismo.

La presencia de compuestos farmacéuticos activos en los ecosistemas acuáticos es cada vez más notable debido a su amplio uso en todo el mundo, tanto en animales como en humanos (Moro *et al.*, 2014). La mayoría de ellos no son completamente eliminados por el cuerpo, y son excretados mediante las heces y la orina como una mezcla de metabolitos o compuestos sin alterar en los sistemas de aguas residuales, así como en los ecosistemas acuáticos y terrestres (Heberer, 2002; Moro *et al.*, 2014; Aguirre-Martínez *et al.*, 2015).

La descarga por pulsos de los fármacos en el ambiente acuático puede originar elevadas concentraciones de los mismos en las aguas superficiales durante cortos periodos de tiempo, pero suficiente para inducir efectos tóxicos en los organismos (Prado *et al.*, 2015). Por tanto, estos productos representan una preocupación creciente debido a las consecuencias que pueden tener en la biota acuática (Aguirre-Martínez *et al.*, 2015). Además, se conoce poco acerca de los potenciales efectos adversos que pueden provocar los fármacos en las poblaciones de microalgas, lo que puede afectar en última instancia al ciclo de nutrientes y al balance de oxígeno (Vannini *et al.*, 2011). Debido a esto, las microalgas son utilizadas con frecuencia en el análisis ecotoxicológico de las aguas (Prado *et al.*, 2015).

Los efectos que los fármacos pueden tener en las mismas son evaluados, generalmente, mediante pruebas de toxicidad basadas en la inhibición del crecimiento (Moro *et al.*, 2014) y en otros parámetros como la actividad celular o el contenido de pigmentos. Este último se considera indicador de toxicidad xenobiótica (Nie *et al.*, 2009; Vannini *et al.*, 2011; Moro *et al.*, 2014), inhibición de la fotosíntesis (Escher *et al.*, 2005; Moro *et al.*, 2014) y otros procesos metabólicos relacionados con el crecimiento (Pomati *et al.*, 2004; Moro *et al.*, 2014).

El ibuprofeno es uno de los fármacos activos más utilizados en el mundo (Ferrando-Climent *et al.*, 2012), ya que se puede comprar sin prescripción médica (Cleuvers, 2004; Boltes & González-Naranjo, 2013), y se utiliza tanto en medicina humana como en prácticas veterinarias (Pomati *et al.*, 2004). De hecho, se producen varios miles de toneladas por año de fármacos antiinflamatorios no esteroideos como el ibuprofeno (Cleuvers, 2004). Por ello, es importante realizar un estudio sobre su posible efecto tóxico en las microalgas.

2. Objetivo

El objetivo general del presente trabajo fue estudiar el potencial efecto tóxico de un antiinflamatorio de uso común, el ibuprofeno, sobre una microalga dulceacuícola, *Scenedesmus quadricauda* (Turpin) Brebisson. Se evaluó su efecto en el crecimiento, en el contenido en pigmentos fotosintéticos y en la actividad celular, medida como actividad esterasa.

3. Materiales y métodos

3.1 Descripción de la especie

La especie utilizada para este estudio fue *Scenedesmus quadricauda* (Turpin) Brebisson (Figura 1), una microalga dulceacuícola de la familia *Scenedesmaceae*, orden *Sphaeropleales* y clase *Chlorophyceae*, dentro de la división *Chlorophyta*.

Normalmente, las células se agrupan en cenobios de cuatro u ocho células, los cuales se forman dentro de la pared de la célula madre y se liberan para formar una nueva colonia o dispersarse como organismos unicelulares independientes. Cuando está aislada, esta especie presenta células cilíndricas, mientras que cuando forma cenobios de 4 células, las del centro son rectangulares y las externas un poco convexas. Además, en este caso, las células externas poseen dos espinas que se proyectan hacia fuera en un ángulo de 45° (Ortega-Mayogoitia & Rojo, 2000). La morfología de las células y la formación de las espinas se ve determinada por variaciones de las condiciones químicas del medio en el que se encuentran (Shubert & Trainor, 1974).

S. quadricauda es una especie indicadora de ambientes eutróficos (Rosenström & Lepistö, 1996) y presenta una amplia distribución en toda España (Cambra *et al.*, 1998).



Figura 1. Fotografía de *Scenedesmus quadricauda* bajo el microscopio (Gerd Günther, <http://www.konstruktion.de/spektrum/aktueller-forschungsstand-in-der-mikroalgentechnologie/>).

3.2 Cultivo microalgal

Los cultivos de *Scenedesmus quadricauda* se realizan en medio Bristol (Brown *et al.*, 1967) modificado, cuya formulación de macronutrientes es la siguiente:

CaCl ₂ .2H ₂ O	25 mg l ⁻¹
MgSO ₄ .7H ₂ O	75 mg l ⁻¹
K ₂ HPO ₄	75 mg l ⁻¹
KH ₂ PO ₄	175 mg l ⁻¹
NaCl	25 mg l ⁻¹
NaNO ₃	340 mg l ⁻¹

El medio de cultivo se prepara en agua destilada y, una vez preparado, se esteriliza en autoclave a 120°C durante 20 min. A esta mezcla de macronutrientes se le añaden, en condiciones de esterilidad, 3 ml l⁻¹ de una solución *stock* de oligoelementos (Fábregas *et al.*, 1984) para dar las siguientes concentraciones finales de micronutrientes:

Tiamina	35 µg l ⁻¹
Biotina	5 µg l ⁻¹
Vitamina B ₁₂	3 µg l ⁻¹
Citrato férrico	20 µM
ZnCl ₂	1 µM
MnCl ₂ .4H ₂ O	1 µM
Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O	1 µM
CoCl ₂	0.1 µM
CuSO ₄ .5H ₂ O	0.1 µM

Esta solución *stock* de oligoelementos se prepara añadiendo 0.5 g de Algal (Nutrición Avanzada S.A.) en 100 ml de agua destilada, se esteriliza en el autoclave a 120°C durante 20 minutos, y se almacena a 4°C en oscuridad.

Finalmente, se añade bicarbonato sódico (NaHCO₃) por filtración en condiciones estériles, a una concentración de 750 mg l⁻¹.

Los cultivos *stock* se realizan en botellas *Pyrex* de 1 l y se mantienen en una cámara de cultivo bajo condiciones controladas de luz y temperatura. La iluminación, de 68.25 µmol fotón m⁻² s⁻¹, es proporcionada por tubos fluorescentes *Philips TLD* de 36 W y aplicada con un ciclo de 12 horas de luz y 12 horas de oscuridad. La temperatura se mantiene constante a 18±1°C.

3.3 Ibuprofeno

El ibuprofeno o ácido 2-(4-isobutilfenil) propanoico, es un fármaco antiinflamatorio no esteroideo derivado del ácido propanoico, ampliamente utilizado como analgésico, antirreumático y antipirético (Moro *et al.*, 2014). Su estructura se basa en un anillo bencénico conjugado con ácido propanoico (Figura 2).

La acción de este fármaco consiste en la inhibición de las ciclooxigenasas (Vane, 1971), que son enzimas clave en la biosíntesis de las prostaglandinas responsables de la generación de dolor e inflamaciones (Vane *et al.*, 1998).

El ibuprofeno está presente principalmente en las aguas residuales y en los ríos y lagos de Europa (Moro *et al.*, 2014) y tiene una vida media de 32 días (Tixier *et al.*, 2003; Aguirre-Martínez *et al.*, 2015). Además, es un contaminante persistente porque no se destruye en las estaciones de tratamiento de agua municipales (Fent *et al.*, 2006; Moro *et al.*, 2014) y tiene tendencia a bioacumularse, induciendo efectos perjudiciales en los ambientes terrestres y acuáticos (Miège *et al.*, 2009; Moro *et al.*, 2014).

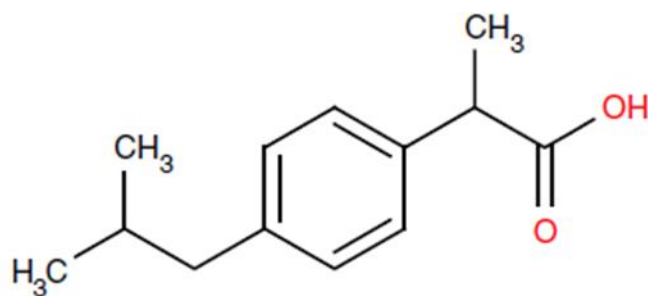


Figura 2. Estructura del ibuprofeno (Ferrando-Climent *et al.*, 2012).

La solución *stock* se prepara a partir de ibuprofeno-sódico en agua destilada a una concentración de 100 g l⁻¹, y se conserva a temperatura ambiente durante el tiempo de duración de los experimentos.

3.4 Determinación del crecimiento

3.4.1 Densidad óptica

El crecimiento celular se determina diariamente mediante la medida de la densidad óptica en un espectrofotómetro Shimadzu UV-1700, frente a un blanco de agua destilada, y a una longitud de onda de 530 nm. Se probaron diferentes longitudes de onda (530, 680 y 750 nm) (Griffiths *et al.*, 2011), realizándose curvas patrón de densidad óptica frente a densidad celular, y se escogió aquella que presentó un mejor ajuste ($R^2 = 0,9951$), que fue 530 nm.

3.4.2 Recuento del número de células

El primer y el último día de cultivo se determina la densidad celular (células ml⁻¹), mediante el recuento de una alícuota de cada uno de los cultivos en una cámara Improved Neubauer, utilizando un microscopio óptico de contraste de fases (NIKON Lapophot). En el caso de muestras muy concentradas, se efectúan las diluciones necesarias.

3.4.3 Tasa de crecimiento

Se calculan las tasas de crecimiento para cada tiempo y concentración de ibuprofeno ensayado (μ), expresadas en día⁻¹, mediante la fórmula $\mu = [\ln(N_t) - \ln(N_0)] / \ln 2 (t - t_0)$, donde (t_0) y (t) son el tiempo inicial y final del periodo estudiado, ambos expresados en días, y (N_t) y (N_0) son el número de células ml⁻¹ en dichos tiempos.

3.5 Determinación de la IC₅₀

La concentración efectiva de inhibición (IC₅₀) o concentración del compuesto necesaria para reducir el crecimiento poblacional de la microalga en un 50%, se determina a partir de las densidades celulares. Esto se lleva a cabo mediante el cálculo del porcentaje de inhibición de cada tratamiento, utilizando una curva no lineal basada en un modelo sigmoidal (función logística de tres parámetros), con el paquete de análisis estadístico y gráficas avanzadas SigmaPlot versión 12.0.

3.6 Determinación espectrofotométrica de pigmentos

El análisis espectrofotométrico del contenido en pigmentos de los cultivos se lleva a cabo mediante la recogida de las células por centrifugación de un volumen determinado de cultivo (10 ml) en una centrífuga refrigerada ALC PK121R a 3500 g y 4°C durante 15 minutos. Se retira el sobrenadante y se resuspende la biomasa en un volumen conocido (2 ml) de acetona:metanol (2:1). Las muestras se guardan así durante 24 horas a 4°C y en oscuridad, para que la extracción sea completa. Tras ese tiempo se centrifugan de nuevo, bajo las mismas condiciones, para retirar los restos celulares. Se recoge el sobrenadante resultante, que es el que contiene los pigmentos extraídos, y se realizan lecturas de absorbancia a 664, 647 y 480 nm de longitud de onda en un espectrofotómetro Shimadzu UV-1700, frente a un blanco de acetona:metanol (2:1).

El valor de los coeficientes y la longitud de onda a la cual se produce la máxima absorción varían en función del solvente utilizado (Parsons & Strickland, 1965) y de la microalga empleada. En este caso, se han adoptado los coeficientes de Jeffrey y Humphrey (1975) para las clorofilas, y los de Strickland y Parsons (1972) para los carotenoides totales, utilizando acetona:metanol (2:1) como solvente en ambos casos.

Las ecuaciones empleadas para el cálculo de las concentraciones de pigmentos en el extracto son las siguientes:

$$\text{Clorofila } a = 11.93 A_{664} - 1.93 A_{647}$$

$$\text{Clorofila } b = 20.36 A_{647} - 5.5 A_{664}$$

$$\text{Carotenoides totales} = 4 A_{480}$$

Las clorofilas a y b y los carotenoides totales representan las concentraciones de dichos pigmentos en $\mu\text{g ml}^{-1}$ de extracto, y A_{664} , A_{647} y A_{480} , se corresponden con las absorbancias (D.O = log I₀/I) medidas a una longitud de onda de 664, 647 y 480 nm, respectivamente.

3.7 Análisis de la actividad celular

La actividad celular fue estimada mediante la medida de la actividad esterasa inespecífica o ensayo de la hidrólisis del diacetato de fluoresceína (fluorescein diacetate -FDA-).

El diacetato de fluoresceína (3,6-diacetil-fluoresceína) es un compuesto fluorogénico. Estos se transforman enzimáticamente en productos fluorescentes, que se pueden visualizar mediante microscopía de fluorescencia o puede medirse su absorción en un espectrofotómetro.

El FDA es un éster no polar, no fluorescente y lipofílico, que penetra libremente a través de la membrana de las células activas. Está formado por un anillo de fluoresceína unido a dos grupos acetato, de manera que tras entrar en las células, esterasas no específicas citoplasmáticas hidrolizan los enlaces éster de la molécula, perdiendo así los residuos acetato, los cuales pueden ser utilizados por las células como fuentes de carbono. La fluoresceína libre resultante es una molécula polar e hidrofílica, que emite fluorescencia en el espectro del verde (490 nm) cuando se excita con luz azul, y es retenida por las células cuando la membrana plasmática está intacta. De esta manera, la ausencia de fluorescencia verde en células viables con la membrana celular intacta, indicaría efectos tóxicos sobre la actividad de las enzimas esterasas, esenciales para el funcionamiento normal de la célula (Jochem, 2000). Por lo tanto, analizando si existen diferencias en la fluorescencia emitida por las células metabólicamente activas, se pueden detectar posibles alteraciones en la actividad celular.

Para medir dicha actividad, se toman por duplicado alícuotas de cada cultivo, a las que se añade FDA a una concentración final de $10 \mu\text{g ml}^{-1}$. A una de las réplicas se le añade inmediatamente acetona para parar la reacción (concentración final del 50% v/v), y se guarda a 4°C en oscuridad. La otra réplica se incuba a temperatura ambiente durante 4 horas, se añade acetona para parar la reacción (concentración final de 50% v/v), y se guarda en las mismas condiciones. Todas las suspensiones celulares (tiempo 0 y tras la incubación) se dejan extrayendo durante 72 horas. Finalmente, se centrifugan en una centrífuga refrigerada ALC PK121R a 3500 g durante 15 min a 4°C, y se mide la absorbancia de los sobrenadantes a 490 nm en un espectrofotómetro Shimadzu UV-1700, frente a un blanco de agua destilada:acetona (1:1).

Al valor de absorbancia obtenido tras el tiempo de incubación, se le resta la absorbancia obtenido en tiempo 0 y se calcula la actividad del extracto a partir de una recta patrón, obtenida a partir de concentraciones de fluoresceína entre $0,5 \mu\text{g ml}^{-1}$ y $4 \mu\text{g ml}^{-1}$ en agua destilada frente a un blanco también de agua destilada. Los resultados de actividad se expresan en μg de fluoresceína por mililitro de cultivo y por hora ($\mu\text{g ml}^{-1} \text{ h}^{-1}$).

3.8 Análisis estadístico

Se calculan las medias y las desviaciones estándar de cada tratamiento y de los controles para todos los parámetros analizados (crecimiento, contenido en pigmentos y actividad celular).

Para determinar diferencias significativas entre los distintos tratamientos, los datos se analizan estadísticamente mediante el estudio de la varianza (ANOVA) con el software IBM SPSS Statistics versión 20.0, con un nivel de confianza del 95%, y bajo la hipótesis de que la concentración de ibuprofeno del medio no afecta al parámetro de estudio. Cuando los resultados son significativos y la hipótesis se rechaza, se utiliza el test de rango múltiple de Tukey para comparar las medias y analizar de qué forma afecta cada concentración de ibuprofeno al parámetro en cuestión, utilizando el mismo programa estadístico (IBM SPSS Statistics 20.0) y con un nivel de significación (p) de 0.05.

Las gráficas se realizan en todos los casos con el paquete de análisis estadístico y de gráficas avanzadas SigmaPlot 12.0, y los resultados se representan con su respectiva desviación estándar.

3.9 Diseño experimental

Para evaluar los potenciales efectos tóxicos de distintas concentraciones de ibuprofeno sobre la microalga *Scenedesmus quadricauda*, se realizaron experiencias de 96 horas de duración, en las que las células fueron expuestas a distintas concentraciones del fármaco ensayado, y los resultados se compararon con un control sin ibuprofeno. Los cultivos se prepararon en tubos *Kimax*, conteniendo 45 ml de cultivo, y se mantuvieron sin aireación en las mismas condiciones de luz y temperatura descritas anteriormente para los cultivos *stock*. Se realizaron tres réplicas de cada concentración y del control, y cada 24 horas se tomaron muestras de cada uno de los cultivos para la determinación de la densidad óptica. La densidad celular se determinó el primer y el último día (96 horas) y los análisis de pigmentos y actividad celular se realizaron a las 96 horas.

4. Resultados y discusión

4.1 Experimento 1

Las concentraciones seleccionadas para estudiar el potencial citotóxico del ibuprofeno-Na en la microalga *S. quadricauda* fueron inicialmente de 25 a 125 mg l⁻¹ (25, 50, 75, 100 y 125 mg l⁻¹), en base a la bibliografía existente acerca del efecto del ibuprofeno sobre otras microalgas (Prado *et al.*, 2015). Los resultados obtenidos tras 96 horas de incubación (Figura 3) no fueron significativos, por lo que se dejaron los cultivos hasta las 336 horas (14 días).

Tras este tiempo de incubación, los cultivos con una concentración de ibuprofeno de 25 mg l⁻¹ crecieron más que el control, lo que puede deberse a que, a bajas concentraciones, algunos compuestos estimulan el crecimiento en lugar de inhibirlo (Franqueira *et al.*, 1999). Sin embargo, estas diferencias no fueron significativas. Se observaron diferencias significativas con respecto al control en los cultivos con mayor concentración del fármaco (75, 100 y 125 mg l⁻¹). Además, los cultivos con 100 y 125 mg l⁻¹ de ibuprofeno vieron reducido su crecimiento de forma significativa con respecto a todos los demás, pero no entre sí.

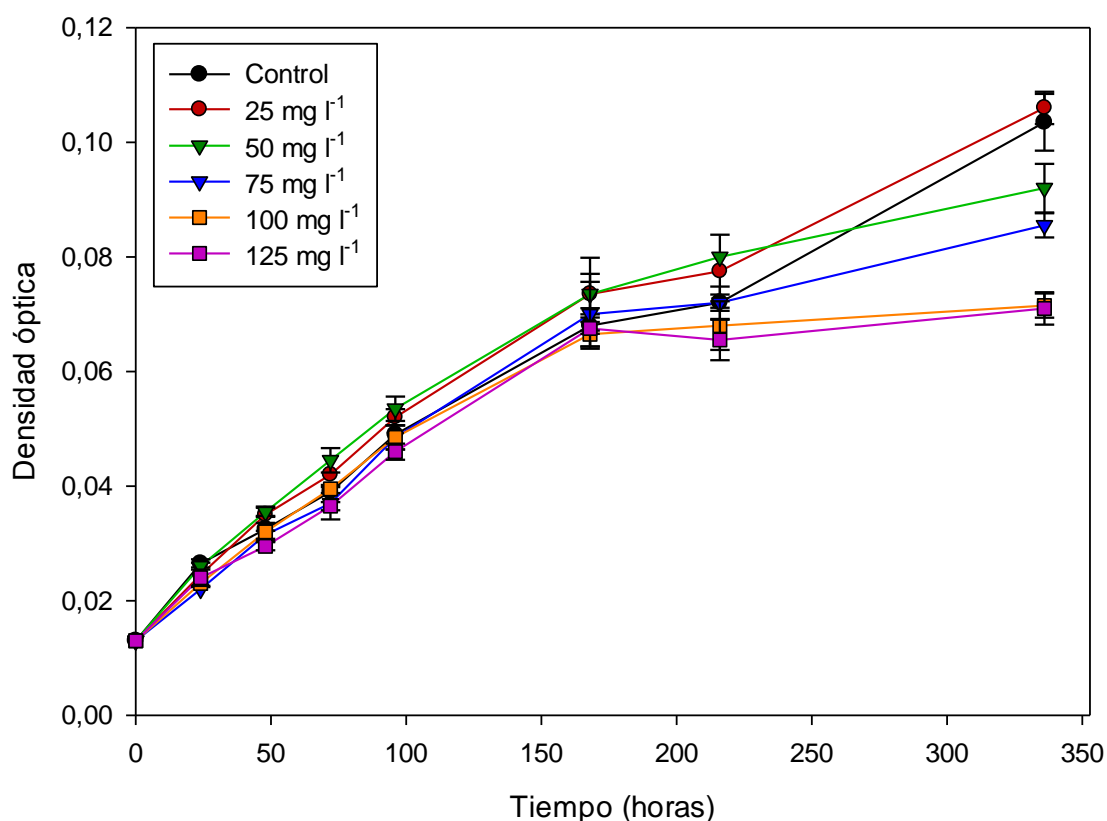


Figura 3. Crecimiento de los cultivos de *Scenedesmus quadricauda* con diferentes concentraciones de ibuprofeno durante 336 horas (14 días) de exposición. Los valores representados son la media de las tres réplicas de cada tratamiento \pm la desviación estándar.

4.2 Experimento 2

En base a los resultados obtenidos en el experimento 1, se ensayaron concentraciones mayores de ibuprofeno, en un rango entre 100 y 1000 mg l⁻¹ (100, 200, 500 y 1000 mg l⁻¹), con el fin de observar el posible efecto tóxico del fármaco sobre el crecimiento.

En la Figura 4 se representan las densidades ópticas obtenidas a las 96 y a las 144 horas, y en ella se observa una disminución del crecimiento al aumentar la concentración de ibuprofeno, especialmente abrupta al pasar de 500 a 1000 mg l⁻¹.

A las 96 horas, la disminución del crecimiento fue significativa en los cultivos con 1000 mg l⁻¹ de ibuprofeno respecto a los demás, así como en los cultivos de 500 mg l⁻¹ en relación al control. A las 144 horas también fue significativa la disminución de la densidad óptica de los cultivos con 500 mg l⁻¹ de ibuprofeno respecto a los cultivos con 100 mg l⁻¹.

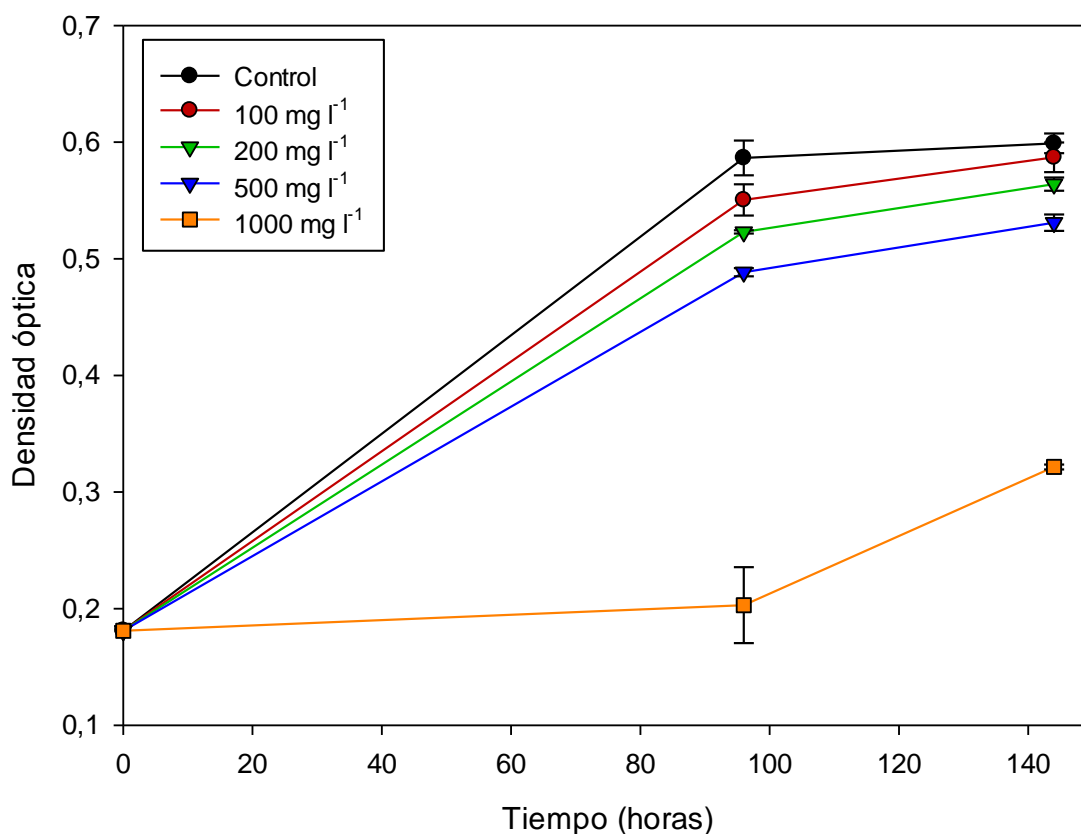


Figura 4. Crecimiento de los cultivos de *Scenedesmus quadricauda* con diferentes concentraciones de ibuprofeno durante 144 horas de exposición. Los valores representados son la media de las tres réplicas de cada tratamiento \pm la desviación estándar.

4.3 Experimento 3

Tras estos dos ensayos previos, las concentraciones de ibuprofeno se ajustaron a 100, 200, 300, 400 y 500 mg l⁻¹. Se realizó una experiencia de 96 horas de duración con una densidad óptica inicial de 0,095, que se correspondió con una densidad celular de 1,275·10⁶ células ml⁻¹, utilizando como control tubos con cultivo microalgal sin ibuprofeno.

4.3.1 Crecimiento

Los cultivos de *S. quadricauda* con una concentración de ibuprofeno igual o superior a 200 mg l⁻¹ mostraron un descenso significativo del crecimiento respecto al control. Las concentraciones más altas (400 y 500 mg l⁻¹) produjeron una inhibición total del mismo.

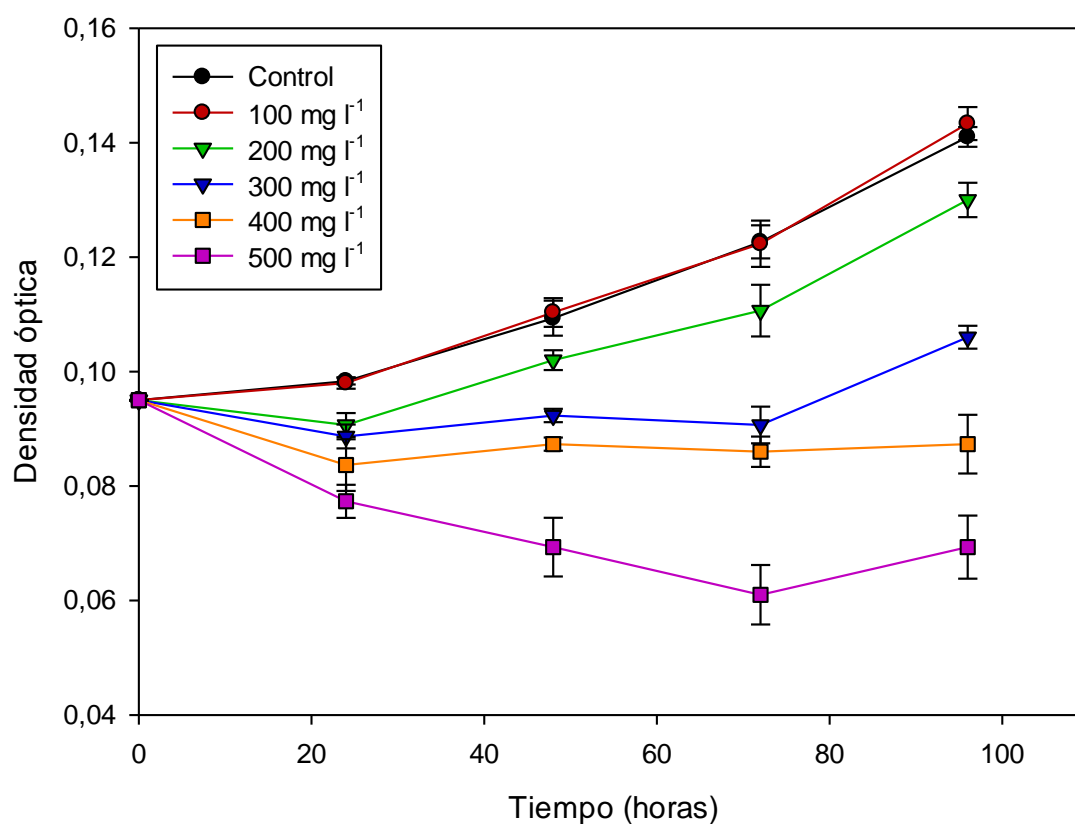


Figura 5. Crecimiento de los cultivos de *Scenedesmus quadricauda* con diferentes concentraciones de ibuprofeno durante 96 horas de exposición. Los valores representados son la media de las tres réplicas de cada tratamiento \pm la desviación estándar.

La Figura 6 muestra el porcentaje de inhibición del crecimiento producido por las diferentes concentraciones de ibuprofeno, tomando el control como el 100 % del crecimiento. Se observa cómo disminuye el crecimiento al aumentar la concentración del fármaco, con excepción de los tratamientos con 100 mg l⁻¹ de ibuprofeno.

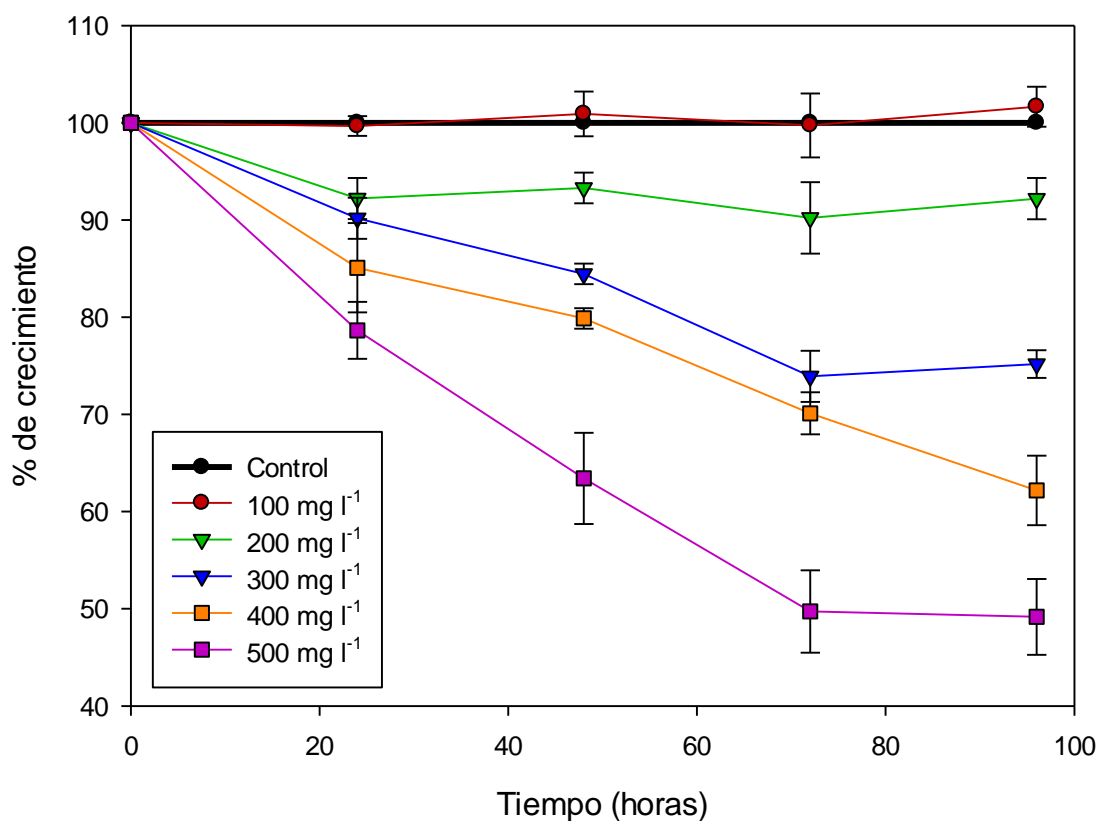


Figura 6. Inhibición del crecimiento de los cultivos sometidos a diferentes concentraciones de ibuprofeno, considerando el crecimiento del control como el 100%. Los valores representados son la media de las tres réplicas de cada tratamiento \pm la desviación estándar.

A partir de la densidad celular inicial y de las densidades celulares medidas el último día (96 horas), se calculó la tasa de crecimiento (Tabla 1).

Cultivo	Densidad celular (96 h)	Tasa de crecimiento (día ⁻¹)
Control	$3,604 \cdot 10^6 \pm 1,769 \cdot 10^5$	$0,374 \pm 0,018$
100 mg l ⁻¹	$3,525 \cdot 10^6 \pm 9,437 \cdot 10^4$	$0,367 \pm 0,009$
200 mg l ⁻¹	$2,925 \cdot 10^6 \pm 1,205 \cdot 10^5$	$0,299 \pm 0,014$
300 mg l ⁻¹	$1,945 \cdot 10^6 \pm 8,779 \cdot 10^4$ *	$0,152 \pm 0,016$ *
400 mg l ⁻¹	$1,217 \cdot 10^6 \pm 1,301 \cdot 10^5$ *	$-0,018 \pm 0,037$ *
500 mg l ⁻¹	$5,042 \cdot 10^5 \pm 8,133 \cdot 10^4$ *	$-0,338 \pm 0,058$ *

Tabla 1. Densidades celulares y tasas de crecimiento de los cultivos expuestos a diferentes concentraciones de ibuprofeno tras 96 horas. Los valores representados son la media de las tres réplicas de cada tratamiento \pm la desviación estándar. Los asteriscos indican diferencias significativas.

Al comparar los datos obtenidos con el test de Tukey, se obtuvo la siguiente ordenación, tanto para las densidades celulares como para las tasas de crecimiento:

$$0 = 100 = 200 > 300 > 400 > 500$$

La concentración efectiva de inhibición (IC_{50}) o concentración del compuesto necesaria para reducir el crecimiento poblacional de la microalga en un 50% fue $364,75 \text{ mg l}^{-1}$ de ibuprofeno (Figura 7).

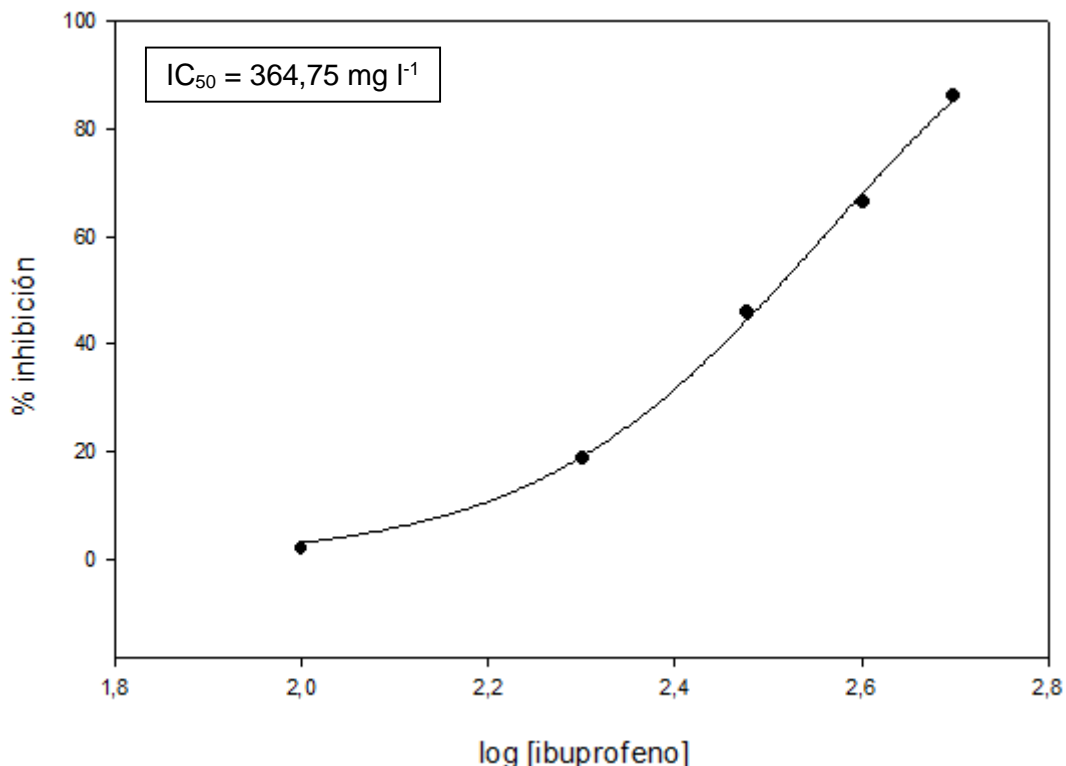


Figura 7. Curva dosis-respuesta en la que se representa la inhibición del crecimiento, expresado en porcentaje con respecto al control, frente al logaritmo de la concentración de ibuprofeno tras 96 horas de exposición.

Estos resultados coinciden con los obtenidos por Cleuvers (2003), quien aplicó concentraciones de ibuprofeno de 1 a 320 mg l^{-1} en cultivos de la microalga *Desmodesmus subspicatus* (anteriormente denominada *Scenedesmus subspicatus*) y obtuvo una IC_{50} de 315 mg l^{-1} . Posteriormente, repitió el experimento con un rango de concentraciones de 72 a 626 mg l^{-1} de ibuprofeno, y obtuvo una IC_{50} de $342,2 \text{ mg l}^{-1}$ para la misma microalga (Cleuvers, 2004). En ambos casos, la concentración efectiva de inhibición resultante es similar a la de este experimento: 364 mg l^{-1} .

Por otra parte, Aguirre-Martínez *et al.* (2015) probaron concentraciones de 0.00005 a 500 mg l^{-1} de ibuprofeno sobre la microalga dulceacuícola *Pseudokirchneriella subcapitata*, y sólo observaron una disminución significativa del crecimiento al pasar de 100 a 500 mg l^{-1} , lo que también concuerda con los resultados de este trabajo.

En otro estudio sobre el efecto tóxico del ibuprofeno en microalgas, Moro *et al.* (2014), probaron los efectos de 62.5, 250 y 1000 $\mu\text{g l}^{-1}$ durante 30 días sobre la microalga *Scenedesmus rubescens*. Con unas concentraciones inferiores a las aquí estudiadas pero con un mayor tiempo de cultivo, las células exhibieron un efecto dosis-dependiente, más evidente en la concentración más alta.

La Directiva EU 93/67/ECC (Comisión de las Comunidades Europeas, 1996) clasifica las sustancias según su valor IC_{50} : $<1 \text{ mg l}^{-1}$ (muy tóxico para los organismos acuáticos), $1-10 \text{ mg l}^{-1}$ (tóxico para los organismos acuáticos), $10-100 \text{ mg l}^{-1}$ (peligroso para los organismos acuáticos), y las sustancias con una IC_{50} superior a 100 mg l^{-1} no son clasificadas (Cleuvers, 2003; Cleuvers, 2004). Por lo tanto, según esta clasificación, el ibuprofeno no es una sustancia tóxica, al menos para esta especie en concreto. Sin embargo, el principal problema es su continua liberación al ambiente y la posible combinación con otros fármacos o sustancias (Cleuvers, 2003). Además, aunque la concentración del fármaco en las aguas residuales suele ser muy inferior, del orden de $\mu\text{g l}^{-1}$, siendo la media $7,5 \mu\text{g l}^{-1}$ de ibuprofeno en las aguas dulces de Galicia (Rodil *et al.*, 2012), las densidades de población de microalgas en aguas naturales y residuales también son inferiores, por lo que la cuota celular es similar.

La inhibición del crecimiento en microalgas parece no ser suficientemente sensible para detectar el efecto de fármacos como el ibuprofeno (Aguirre-Martínez *et al.*, 2015), ya que las concentraciones a las que producen inhibición de crecimiento son muy elevadas.

4.1 Pigmentos

El contenido en clorofilas a y b se ha descrito como el índice ideal para evaluar el efecto de los contaminantes en las tasas fotosintética y respiratoria de las microalgas (Xu *et al.*, 2013).

Los resultados obtenidos en cuanto al contenido en pigmentos, tanto por mililitro de cultivo (Figura 8A) como por célula (Figura 8B), mostraron un descenso de los mismos al aumentar la concentración de ibuprofeno.

El contenido de clorofila a fue mayor en todos los casos (por mililitro de cultivo y por célula), seguido de los carotenoides, siendo la clorofila b el pigmento menos abundante.

El efecto negativo del ibuprofeno en el contenido en pigmentos de *S. quadricauda* ($\mu\text{g ml}^{-1}$) fue dependiente de concentración, con excepción de los cultivos con 100 mg l^{-1} de ibuprofeno. De esta manera, el contenido de clorofila a fue máximo en el control y en los cultivos de 100 mg l^{-1} ($0,502 \pm 0,055$ y $0,513 \pm 0,042 \mu\text{g ml}^{-1}$, respectivamente) y disminuyó hasta su valor mínimo en los cultivos con mayor concentración del fármaco ($0,017 \pm 0,008 \mu\text{g ml}^{-1}$). Con el contenido de clorofila b ocurrió lo mismo: la concentración de este pigmento disminuyó desde los controles y los cultivos de 100 mg l^{-1} ($0,141 \pm 0,019$ y $0,140 \pm 0,024 \mu\text{g ml}^{-1}$, respectivamente), hasta su mínima concentración en los cultivos con 500 mg l^{-1} de fármaco ($0,006 \pm 0,005 \mu\text{g ml}^{-1}$). El mayor contenido en carotenoides lo presentaron los cultivos control ($0,239 \pm 0,025 \mu\text{g ml}^{-1}$) y los cultivos con 100 mg l^{-1} de ibuprofeno ($0,244 \pm 0,022 \mu\text{g ml}^{-1}$), y el mínimo, los cultivos con 500 mg l^{-1} del compuesto ensayado ($0,008 \pm 0,004 \mu\text{g ml}^{-1}$).

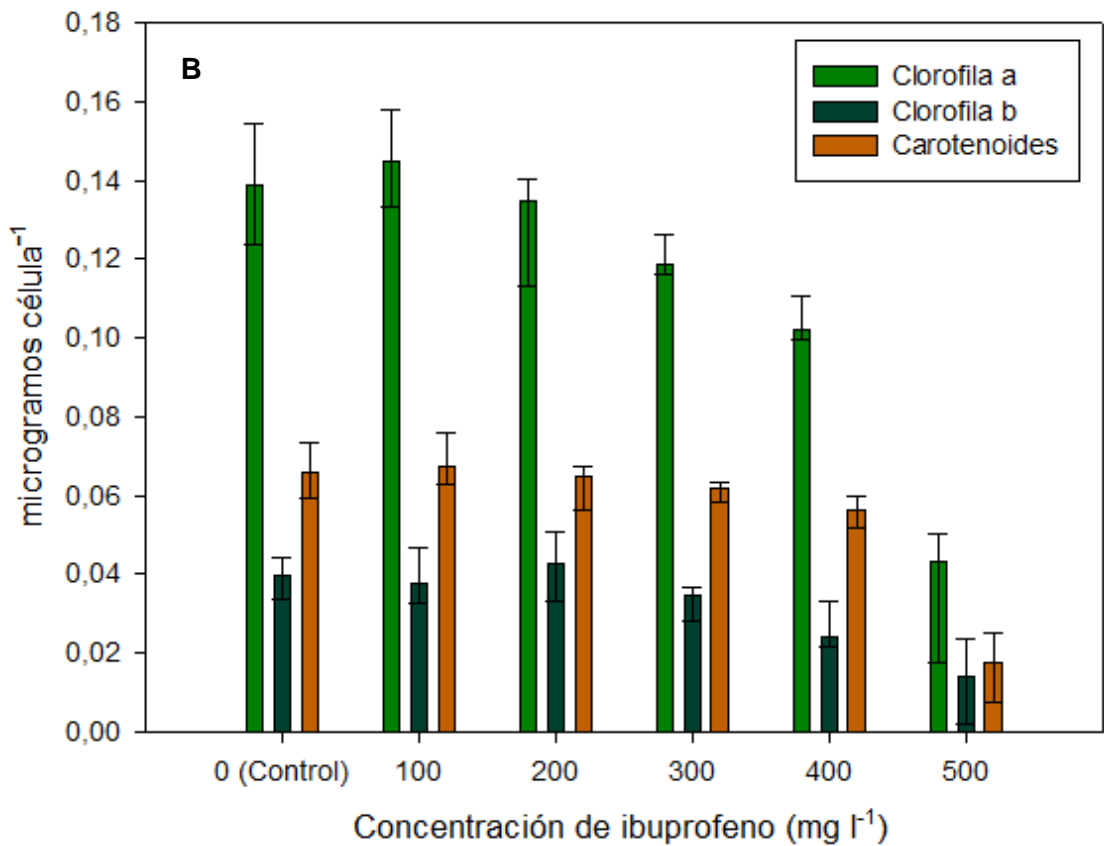
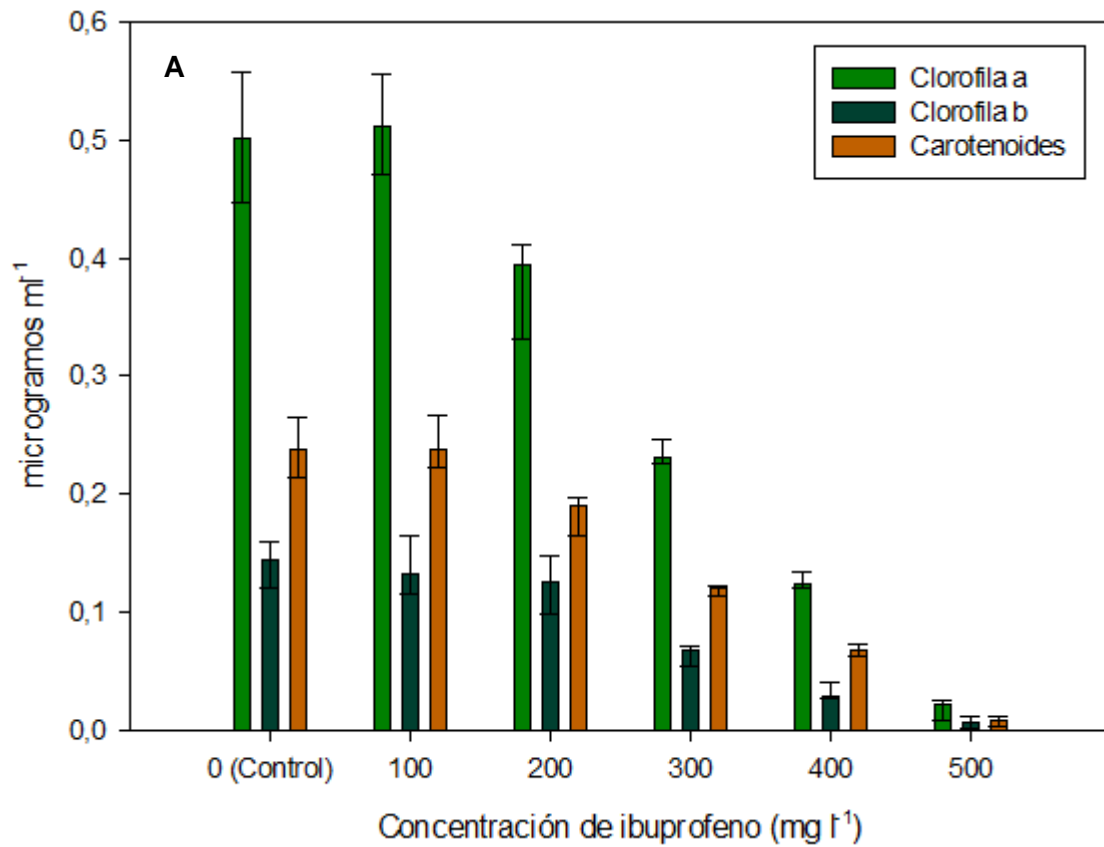


Figura 8. Contenido en pigmentos, expresado en microgramos por mililitro de cultivo (A) y por célula (B) en cada uno de los tratamientos. Los valores representados son la media de las tres réplicas de cada tratamiento \pm la desviación estándar.

Las diferencias en el contenido de clorofila a y de carotenoides por mililitro de cultivo fueron estadísticamente significativas entre todos los cultivos, excepto entre el control y el cultivo con 100 mg l⁻¹ de ibuprofeno. El contenido de clorofila b por mililitro de cultivo presentó diferencias significativas entre los cultivos control, 100 y 200 mg l⁻¹ con respecto a los de 300, 400 y 500 mg l⁻¹ (Tabla 2).

En cuanto al contenido celular en pigmentos, en la Figura 8B se observa que la concentración de clorofila a disminuye al aumentar la concentración de ibuprofeno, siendo significativas las diferencias de todos los cultivos respecto al más concentrado (500 mg l⁻¹). También es significativo el descenso del contenido en clorofila a en el cultivo de 400 mg l⁻¹, respecto a los cultivos control y con 100 mg l⁻¹ del fármaco. En el caso de la clorofila b, su contenido celular desciende al aumentar la concentración de ibuprofeno, excepto en el cultivo de 200 mg l⁻¹, aunque estas diferencias no son significativas. El descenso en el contenido en clorofila b sólo fue significativo en los cultivos de mayor concentración (500 mg l⁻¹) respecto al control y a los cultivos de 100 y 200 mg l⁻¹. El contenido celular de carotenoides es significativamente menor en el cultivo de 500 mg l⁻¹, en relación a todos los demás.

	$\mu\text{g ml}^{-1}$	$\mu\text{g célula}^{-1}$
Clorofila a	0 = 100 > 200 > 300 > 400 > 500	0 = 100 = 200 = 300 > 500 ; 0 = 100 > 400 > 500
Clorofila b	0 = 100 = 200 > 300 = 400 = 500 ; 300 > 500	0 = 100 = 200 > 500
Carotenoides	0 = 100 > 200 > 300 > 400 > 500	0 = 100 = 200 = 300 = 400 > 500

Tabla 2. Ordenación de los cultivos expuestos a diferentes concentraciones de ibuprofeno, según las diferencias significativas en el contenido en pigmentos, tanto por mililitro de cultivo como por célula, al compararlos estadísticamente mediante el test de Tukey.

Estos resultados concuerdan con los de Moro *et al.* (2014), quienes observaron una disminución en el contenido en clorofilas a y b, dependiente de la concentración de ibuprofeno.

Como ya se ha indicado anteriormente, la reducción del contenido en pigmentos se considera indicador de toxicidad xenobiótica (Nie *et al.*, 2009; Vannini *et al.*, 2011; Moro *et al.*, 2014), inhibición de la fotosíntesis (Escher *et al.*, 2005; Moro *et al.*, 2014) y otros procesos metabólicos relacionados con el crecimiento (Pomati *et al.*, 2004; Moro *et al.*, 2014).

4.2 Actividad celular

Los resultados obtenidos muestran un efecto negativo del ibuprofeno sobre la actividad esterasa en *S. quadricauda* a medida que se aumenta la concentración del compuesto (Figura 9).

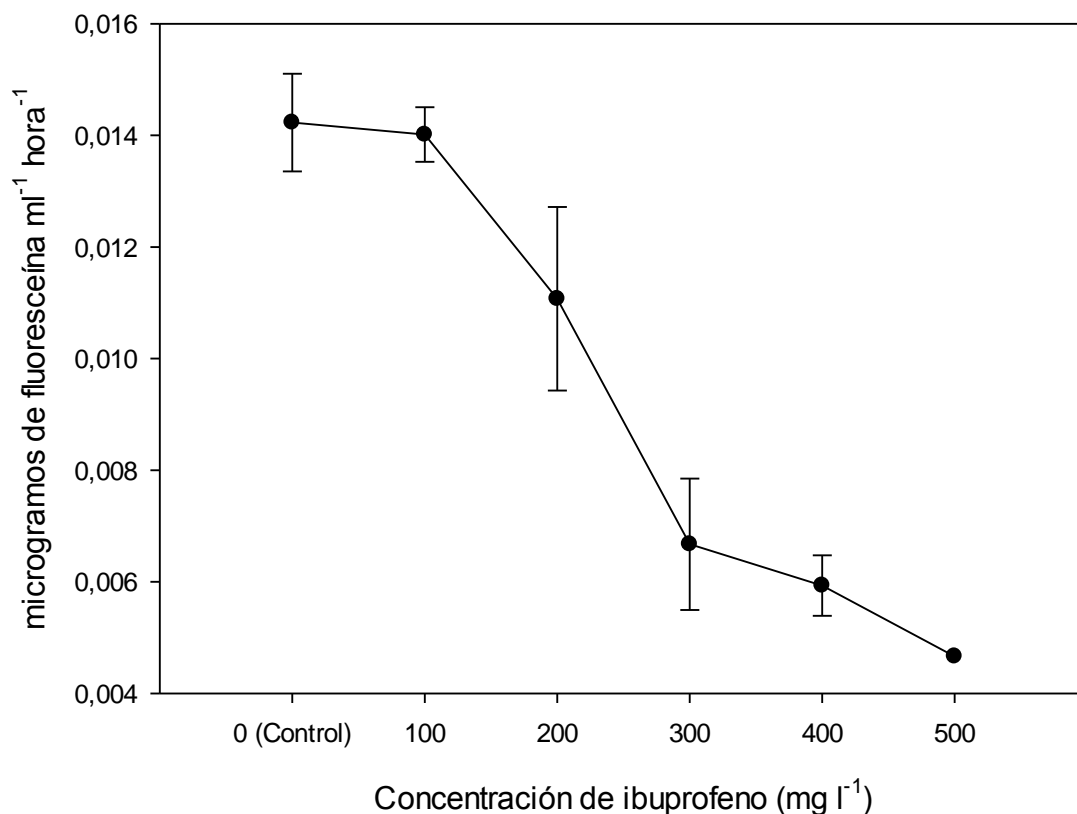


Figura 9. Actividad de *Scenedesmus quadricauda*, expresada en microgramos de fluoresceína por mililitro de cultivo y por hora. Los valores representados son la media de tres réplicas de cada tratamiento \pm la desviación estándar.

Tras 96 horas de exposición, la actividad de los cultivos con 100 mg l⁻¹ de ibuprofeno fue similar a la del control, y se redujo al aumentar la concentración del fármaco, siendo prácticamente indetectable en los cultivos con concentraciones de ibuprofeno de 400 y 500 mg l⁻¹. Estos resultados coinciden con los obtenidos en este trabajo para el crecimiento y el contenido en pigmentos.

Al comparar los resultados con el test de Tukey, se obtuvo la siguiente ordenación en cuanto a la actividad esterasa:

$$0 = 100 = 200 > 300 = 400 = 500$$

Estos resultados concuerdan con los obtenidos por Prado *et al.* (2015), quienes estudiaron el efecto del ibuprofeno (25-180 mg l⁻¹) en las microalgas *Chlamydomonas moewusii* y *Chlorella vulgaris*, y observaron una reducción significativa de la actividad esterasa respecto al control.

4.3 Alteraciones morfológicas

El ibuprofeno, además de afectar al crecimiento, al contenido en pigmentos y a la actividad celular, también afectó a la morfología de las células.

Las células de *S. quadricauda* del control forman cenobios de cuatro células, alargadas y verdes, debido al mayor contenido en pigmentos (Figura 10A). A medida que se aumenta la concentración del ibuprofeno, los cultivos presentan células más pequeñas y solitarias y menos verdes (Figura 10B), debido a la reducción del contenido en pigmentos.

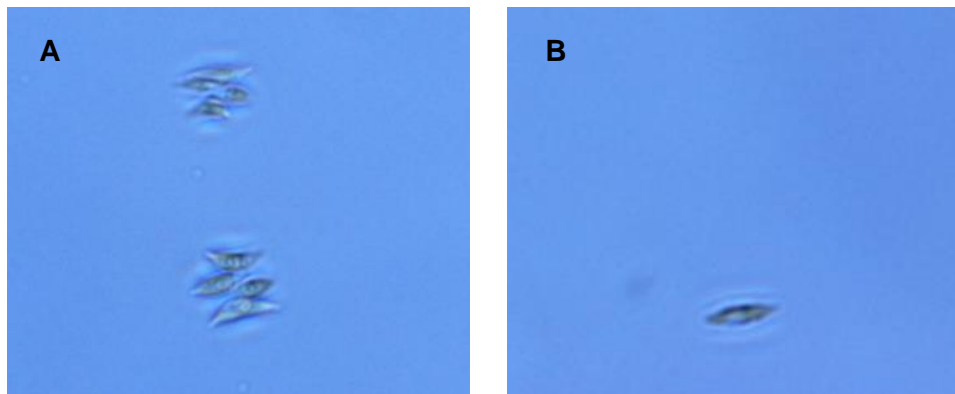


Figura 10. Aspecto de *Scenedesmus quadricauda* de los cultivos control (A) y de los cultivos con una concentración de 500 mg l⁻¹ de ibuprofeno (B), bajo el microscopio óptico.

Además, al ser observadas en un microscopio de fluorescencia (Nikon Eclipse E600), la fluorescencia emitida por las microalgas disminuyó al aumentar la concentración de ibuprofeno, siendo máxima en el control y mínima en los cultivos con una concentración de 500 mg l⁻¹ de ibuprofeno (Figura 11).

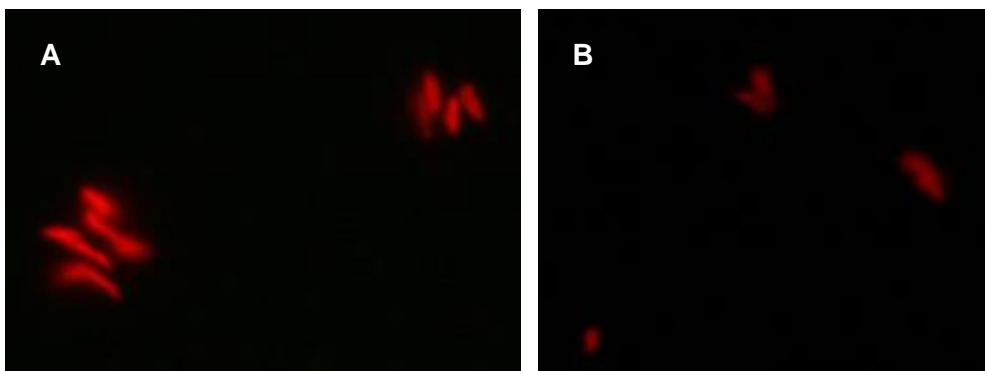


Figura 11. Aspecto de *Scenedesmus quadricauda* de los cultivos control (A) y de los cultivos con una concentración de 500 mg l⁻¹ de ibuprofeno (B), bajo el microscopio de fluorescencia.

5. Conclusiones

A partir de los resultados obtenidos, se pueden extraer las siguientes conclusiones acerca de los efectos del ibuprofeno sobre la microalga dulceacuícola *Scenedesmus quadricauda*:

1. El ibuprofeno inhibe el crecimiento de la microalga *Scenedesmus quadricauda*. Esta inhibición es dependiente de la concentración del fármaco. La IC_{50} obtenida fue $364,75 \text{ mg l}^{-1}$, mayor que la concentración habitual del compuesto en los medios naturales.
2. El contenido en pigmentos de la microalga se reduce al aumentar la concentración de ibuprofeno, lo que puede tener efectos en las tasas fotosintética y respiratoria.
3. La actividad celular, medida como actividad esterasa, se reduce en presencia de ibuprofeno, llegando a ser indetectable en los cultivos con mayor concentración de compuesto.
4. Las microalgas sufren cambios morfológicos en presencia de ibuprofeno, más evidentes al aumentar la concentración del mismo, pasando de estar organizadas en cenobios de cuatro células, ser alargadas y verdes debido al contenido en pigmentos, a ser solitarias, más redondeadas y sin coloración verde.

5. Conclusions

1. Ibuprofen inhibits the growth of the microalga *Scenedesmus quadricauda*. This inhibition is concentration-dependent. The IC_{50} obtained was 364.75 mg l^{-1} , higher than the usual concentration of ibuprofen in natural environments.
2. The pigments content of the microalga is reduced by increasing concentrations of ibuprofen; this reduction can affect photosynthesis and respiration rates.
3. Ibuprofen provoked a decrease in the cell activity, measured as esterase activity, of *S. quadricauda* cells, which was undetectable in cultures with the highest drug concentrations.
4. Ibuprofen provoked morphological changes in the microalga *S. quadricauda*, clearly observed in cells exposed to the highest concentrations. Cells appeared isolated, with round shape and bleached due to the decrease in pigments content.

6. Bibliografía

- Aguirre-Martínez, G. V., Owuor, M. A., Garrido-Pérez, C., Salamanca, M. J., Del Valls, T. A. & Martín-Díaz, M. L. (2015). Are standard tests sensitive enough to evaluate effects of human pharmaceuticals in aquatic biota? Facing changes in research approaches when performing risk assessment of drugs. *Chemosphere* 120: 75-85.
- Boltes, K. & González-Naranjo, V. (2013). Ecological risk assessment of ibuprofen in aquatic environments: an approach for complex mixture of contaminants. En: "Ibuprofen: Clinical Pharmacology, Medical Uses and Adverse Effects". Carter, W.C. & Brown, B.R. Nova Science Publishers, pp. 85-158.
- Brown, T. E., Richardson, F. L. & Vaughn, M. L. (1967). Development of red pigmentation in *Chlorococcum wimmeri* (*Chlorophyta: Chlorococcales*). *Phycologia* 6: 167-184.
- Cambra, J., Álvarez-Cobelas, M. & Abgal, M. (1998). Lista florística y bibliográfica de los clorófitos (*Chlorophyta*) de la Península Ibérica, Islas baleares e Islas Canarias. Asociación Española de Limnología, Madrid. 364 pp.
- Griffiths, M.J., Garcin, C., Van Hille, R.P. & Harrison, S. (2011). Interference by pigment in the estimation of microalgal biomass concentration by optical density. *Journal of Microbiological Methods* 85: 119-123.
- Cleuvers, M. (2003). Aquatic ecotoxicity of pharmaceuticals including the assessment of combination effects. *Toxicology Letters* 142: 185-194.
- Cleuvers, M. (2004). Mixture toxicity of the anti-inflammatory drugs diclofenac, ibuprofen, naproxen, and acetylsalicylic acid. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 59: 309-315.
- Commission of the European Communities. (1996). Technical guidance document in support of comission directive 93/67/EEC on risk assessment for new notified substances and commission regulation (EC) No. 1488/94 on risk assessment for existing substances. Part II: Environmental Risk Assessment. Official Publicantions of the European Communities, Luxembourg.
- Escher, B. I., Bramaz, N., Eggen, R. I. L. & Richter, M. (2005). *In vitro* assessment of modes of toxic action of pharmaceuticals in aquatic life. *Environmental Science & Technology* 39: 3090-3100.
- Fábregas, J., Abalde, J., Herrero, C., Cabezas, B. & Veiga, M. (1984). Growth of the marine microalga *Tetraselmis suecica* in batch cultures with different salinities and nutrient concentrations. *Aquaculture* 42: 207-215.
- Farré, M. I., Pérez, S., Kantiani, L., & Barceló, D. (2008). Fate and toxicity of emerging pollutants, their metabolites and transformation products in the aquatic environment. *Trends in Analytical Chemistry* 27: 991-1007.
- Fent, K., Weston, A. A. & Caminada, D. (2006). Ecotoxicology of human pharmaceuticals. *Aquatic Toxicology* 76: 122-159.
- Ferrando-Climent, L., Collado, N., Buttiglieri, G., Gros, M., Rodriguez-Roda, I., Rodriguez-Mozaz, S. & Barceló, D. (2012). Comprehensive study of ibuprofen and its metabolites in activated sludge batch experiments and aquatic environment. *Science of the Total Environment* 438: 404-413.
- Franqueira, D., Cid, A., Torres, E., Orosa, M. & Herrero, C. (1999). A comparison of the relative sensitivity of structural and functional cellular response in the alga *Chlamydomonas eugametos* exposed to the herbicide paraquat. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology* 36: 264-269.

- Heberer, T. (2002). Occurrence, fate, and removal of pharmaceutical residues in the aquatic environment: a review of recent research data. *Toxicology Letters* 131: 5-17.
- Jeffrey, S.W. & Humphrey, G.F. (1975). New spectrophotometric equations for determining chlorophylls a, b, c1 and c2 in higher plants, algae and natural phytoplankton. *Biochemie und Physiologie der Pflanzen* 167: 191-194.
- Jochem, F.J. (2000). Probing the physiological state of phytoplankton at the single cell level. *Scientia Marina* 64: 183-195.
- Konstruktion.de. En: <http://www.konstruktion.de/spektrum/aktueller-forschungsstand-in-der-mikroalgentechnologie/> 16 de Abril, 2015.
- Miège, C., Choubert, J. M., Ribeiro, L., Eusèbe, M. & Coquery, M. (2009). Fate of pharmaceuticals and personal care products in wastewater treatment plants - Conception of a database and first results. *Environmental Pollution* 157: 1721-1726.
- Moro, I., Matozzo, V., Piovan, A., Moschin, E. & Vecchia, F. D. (2014). Morphophysiological effects of ibuprofen on *Scenedesmus rubescens*. *Environmental Toxicology and Pharmacology* 38: 379-387.
- Nie, X., Gu, J., Lu, J., Pan, W. & Yang, Y. (2009). Effects of norfloxacin and butylated hydroxyanisole on the freshwater microalga *Scenedesmus obliquus*. *Ecotoxicology* 18: 677-684.
- Ortega-Mayagoitia, E. & Rojo, C. (2000). Fitoplancton del Parque Nacional las Tablas de Daimiel. III. Diatomeas y Clorofitas. *Anales del Jardín Botánico de Madrid* 58: 17-37.
- Parsons, T R. & Strickland, J.D.H. (1965). Particulate organic matter. III. I. Pigment analysis. III. II. Determination of phytoplankton pigments. *Journal of the Fisheries Research Board of Canada* 18: 117-127.
- Pomati, F., Netting, A. G., Calamari, D., & Neilan, B. A. (2004). Effects of erythromycin, tetracycline and ibuprofen on the growth of *Synechocystis* sp. and *Lemna minor*. *Aquatic Toxicology* 67, 387-396.
- Prado, R., García, R., Rioboo, C., Herrero, C. & Cid, A. (2015). Suitability of cytotoxicity endpoints and test microalgal species to disclose the toxic effect of common aquatic pollutants. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 114: 117-125.
- Rodil, R., Quintana, J.B., Concha-Graña, E., López-Mahía, P., Muniategui-Lorenzo, S. & Prada-Rodríguez, D. (2012). Emerging pollutants in sewage, surface and drinking water in Galicia (NW Spain). *Chemosphere* 86: 1040-1049.
- Rosenström, U. & Lepistö, L. (1996). Phytoplankton indicator species of different types of boreal lakes. *Algological studies* 82: 131-140.
- Shubert, L. E. & Trainor, F. R. (1974). *Scenedesmus* morphogenesis. Control of the unicell stage with phosphorus. *Journal of Phycology* 9: 1-7.
- Strickland, J. D. H. & Parsons, T. R. (1972). "A Practical Handbook of Seawater Analysis". 2^o ed. Fisheries Research Board of Canada, Ottawa. 310 pp.
- Tixier, C., Singer, H. P., Oellers, S. & Müller, S. R. (2003). Occurrence and fate of carbamazepine, clofibrac acid, diclofenac, ibuprofen, ketoprofen, and naproxen in surface waters. *Environmental Science and Technology* 37: 1061-1068.
- Vane, J. R. (1971). Inhibition of prostaglandin synthesis as a mechanism of action for aspirin-like drugs. *Nature* 231: 232-235.
- Vane, J. R., & Botting, R. M. (1998). Mechanism of action of nonsteroidal anti-inflammatory drugs. *American Journal of Medicine* 104: 2S-8S.

- Vannini, C., Domingo, G., Marsoni, M., De Mattia, F., Labra, M., Castiglioni, S., & Bracale, M. (2011). Effects of a complex mixture of therapeutic drugs on unicellular algae *Pseudokirchneriella subcapitata*. *Aquatic Toxicology* 101: 459-465.
- Xu, D., Li, C., Chen, H. & Shao, B. (2013). Cellular response of freshwater green algae to perfluorooctanoic acid toxicity. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 88: 103-107.