



UNIVERSIDADE DA CORUÑA

Facultade de Ciencias

Departamento de Biología Celular y Molecular

Área de Microbiología

**Estudo do potencial efecto tóxico de dous filtros solares
químicos, Octocrileno e Benzofenona-3, sobre a microalga
mariña *Tetraselmis suecica***

**Estudio del posible efecto tóxico de dos filtros solares químicos,
Octocrileno y Benzofenona-3, sobre la microalga marina
*Tetraselmis suecica***

**Study of the potential toxic effect of two chemical UV filters,
Octocrylene and Benzophenone-3, on marine microalgae
*Tetraselmis suecica***

Alba M^a Rodríguez López

Traballo de fin de grao

Data de defensa: 29 de xuño de 2015

Dirixido pola Dra. Ángeles Cid Blanco

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 de A Coruña, bajo la dirección de Ángeles Cid Blanco, Profesora Titular de Universidad de la Facultade de Ciencias de la Universidade de A Coruña.

Índice

RESUMEN	1
ABSTRACT	2
INTRODUCCIÓN	3
OBJETIVO	5
MATERIALES Y MÉTODOS	5
• DESCRIPCIÓN DE LA ESPECIE DE MICROALGA UTILIZADA	5
• DESCRIPCIÓN DE LOS DOS FILTROS SOLARES QUÍMICOS	6
• CULTIVO MICROALGAL	8
• RECUENTO CELULAR Y CÁLCULO DE LA TASA DE CRECIMIENTO (μ)	8
• DETERMINACIÓN DE PIGMENTOS MEDIANTE ESPECTROFOTOMETRÍA	9
• ESTUDIO DE LA ACTIVIDAD CELULAR BASADA EN LA HIDRÓLISIS DE FDA	9
• DISEÑO EXPERIMENTAL	10
• ANÁLISIS ESTADÍSTICOS	11
RESULTADOS Y DISCUSIÓN	12
EXPERIMENTO 1	12
• DENSIDAD Y CRECIMIENTO CELULAR	12
EXPERIMENTO 2	14
• CRECIMIENTO CELULAR	14
• DETERMINACIÓN DE PIGMENTOS	17
• ACTIVIDAD CELULAR	19
CONCLUSIONES	20
CONCLUSIONS	21
BIBLIOGRAFÍA	22

Resumen

El uso generalizado de filtros solares en productos de cuidado personal, incluyendo los protectores solares y los cosméticos, o como aditivos industriales, ha planteado preocupaciones sobre el posible efecto que pueden presentar sobre los organismos vivos. Esto hace que sea importante la realización de estudios para determinar la ecotoxicidad de estos compuestos.

En este trabajo se evalúa el efecto del Octocrileno (OC) y de la combinación de este con la Benzofenona-3 (BP-3), otro filtro solar muy utilizado, sobre la microalga marina *Tetraselmis suecica*. Se realizaron análisis del crecimiento celular, de la cantidad de pigmentos celulares y de la actividad celular en un ensayo que duró 144h en total. El OC no presenta alteraciones en el crecimiento celular ni en la concentración de pigmentos de la microalga en concentraciones entre 2,5 y 5 mg·L⁻¹, mientras que la BP-3 sí que inhibe el crecimiento celular y reduce la cantidad de carotenoides. La combinación de los dos filtros solares no provoca cambios en el crecimiento celular pero sí aumenta la concentración celular de carotenoides. La actividad, medida mediante la hidrólisis de FDA, es el método que muestra resultados más relevantes. La BP-3, como era de esperar, redujo la actividad en gran medida (3,72 ± 0,31pg de fluoresceína·célula⁻¹·h⁻¹) con respecto al control (17,96 ± 0,75pg de fluoresceína·célula⁻¹·h⁻¹). El OC también presenta un efecto reductor de la actividad celular (9,04 ± 1,05pg de fluoresceína·célula⁻¹·h⁻¹). Este valor es muy próximo al obtenido por la mezcla de OC y BP-3 (8,95 ± 0,20pg de fluoresceína·célula⁻¹·h⁻¹), lo que indica que no existe un efecto sinérgico ni antagonista de los dos filtros solares sobre la actividad de *T. suecica*.

Abstract

The widespread use of UV filters in personal care products, including sunscreens and cosmetics, or as industrial additives, has raised concerns about the possible impact that they may have on living organisms. This makes important the need for more studies to determine the ecotoxicity of these compounds.

In this work the effect of Octocrylene (OC) and the combination of this with the Benzophenone-3 (BP-3), another widely used sunscreen, is evaluated on marine microalgae *Tetraselmis suecica*. Analysis of cell growth, the amount of cell pigments and cellular activity were performed in a test that lasted 144 hours in total. The OC doesn't cause alterations in cell growth nor microalgal pigment amount in concentrations between 2.5 to 5 mg·L⁻¹, whereas BP-3 inhibits cell growth and reduces the amount of carotenoids. The combination of the two UV filters don't cause changes in cell growth but it increase the cellular concentration of carotenoids. The activity measured by the hydrolysis of FDA, is the method that shows more relevant results. As expected the BP-3 largely reduced cell activity (3.72 ± 0.31 pg fluorescein · cell⁻¹ · h⁻¹) compared to the control (17.96 ± 0.75 pg fluorescein · cell⁻¹ · h⁻¹). The OC also has a reducing effect on cell activity (9.04 ± 1.05 pg fluorescein · cell⁻¹ · h⁻¹). This value is very close to that obtained by the mixture of BP-3 and OC (8.95 ± 0.20 pg fluorescein · cell⁻¹ · h⁻¹), indicating that there isn't a synergistic or antagonist effect the two UV filters on the activity of *T. suecica*.

Introducción

La creciente preocupación por los efectos nocivos de la radiación ultravioleta (UV) en la piel, como fotoenvejecimiento, daños en el ADN o cáncer de piel (D'Orazio et al., 2013; Svobodová et al., 2003), ha desencadenado un aumento en el uso de productos de protección solar, cuya principal finalidad es reducir los efectos del sol y proteger la piel humana (Kim & Choi, 2014; Sánchez-Rodríguez et al., 2015). Su efecto protector se debe a la presencia de filtros solares, una serie de compuestos que protegen contra los rayos UV. Estos compuestos pueden ser inorgánicos como el dióxido de titanio (TiO₂) y óxido de zinc (ZnO) u orgánicos como benzofenonas, cinamatos, derivados del alcanfor, triazinas y derivados del crileno, entre otros (Gao et al., 2013; Ramos et al., 2015; Tovar-Sánchez et al., 2013) .

Los filtros solares orgánicos absorben la radiación UV produciendo un estado excitado de la molécula, en el que tiene un mayor contenido de energía. Este exceso de energía se disipa por emisión de longitudes de onda más altas o relajación por procesos fotoquímicos, como por ejemplo isomerización y liberación de calor (Gago-Ferrero et al., 2012). Por el contrario, los filtros solares inorgánicos no absorben la radiación, si no que protegen la piel mediante reflexión y dispersión de la radiación UV (Ramos et al., 2015).

Normalmente en las cremas solares se combinan filtros orgánicos e inorgánicos para conseguir una mayor protección frente a la radiación UV. Dependiendo de las propiedades y el grado de protección deseado, se está comercializando una amplia gama de combinaciones para garantizar la protección contra la mayoría de tipos de daños de la piel inducidos por UV.

Debido a la disolución de estas cremas en el agua, en zonas de playa donde la afluencia de bañistas es alta, muchos filtros solares han aumentado su presencia (Sánchez-Rodríguez et al., 2015; Tovar-Sánchez et al., 2013).

Pero esta no es la única entrada de filtros solares al medio marino, sino que también pueden llegar a través de aguas residuales procedentes de plantas de tratamiento, donde su degradación no es completa (Kupper et al., 2006; Liu, Ying et al., 2012). Los filtros que están presentes en estas aguas residuales proceden, además de las cremas solares que se eliminan durante la ducha, de otros productos cosméticos incluyendo pintalabios, perfumes, geles de baño, champús o lociones (Brausch & Rand, 2011) y de productos poliméricos de protección frente a radiación UV de plásticos, productos farmacéuticos o de mantenimiento de vehículos y de otros bienes industriales (Gago-Ferrero et al., 2013). De esta forma, como se puede observar en la **Figura 1** (Giokas et al., 2007), existen tanto formas directas como indirectas en las que los filtros solares acaban llegando al medio marino.

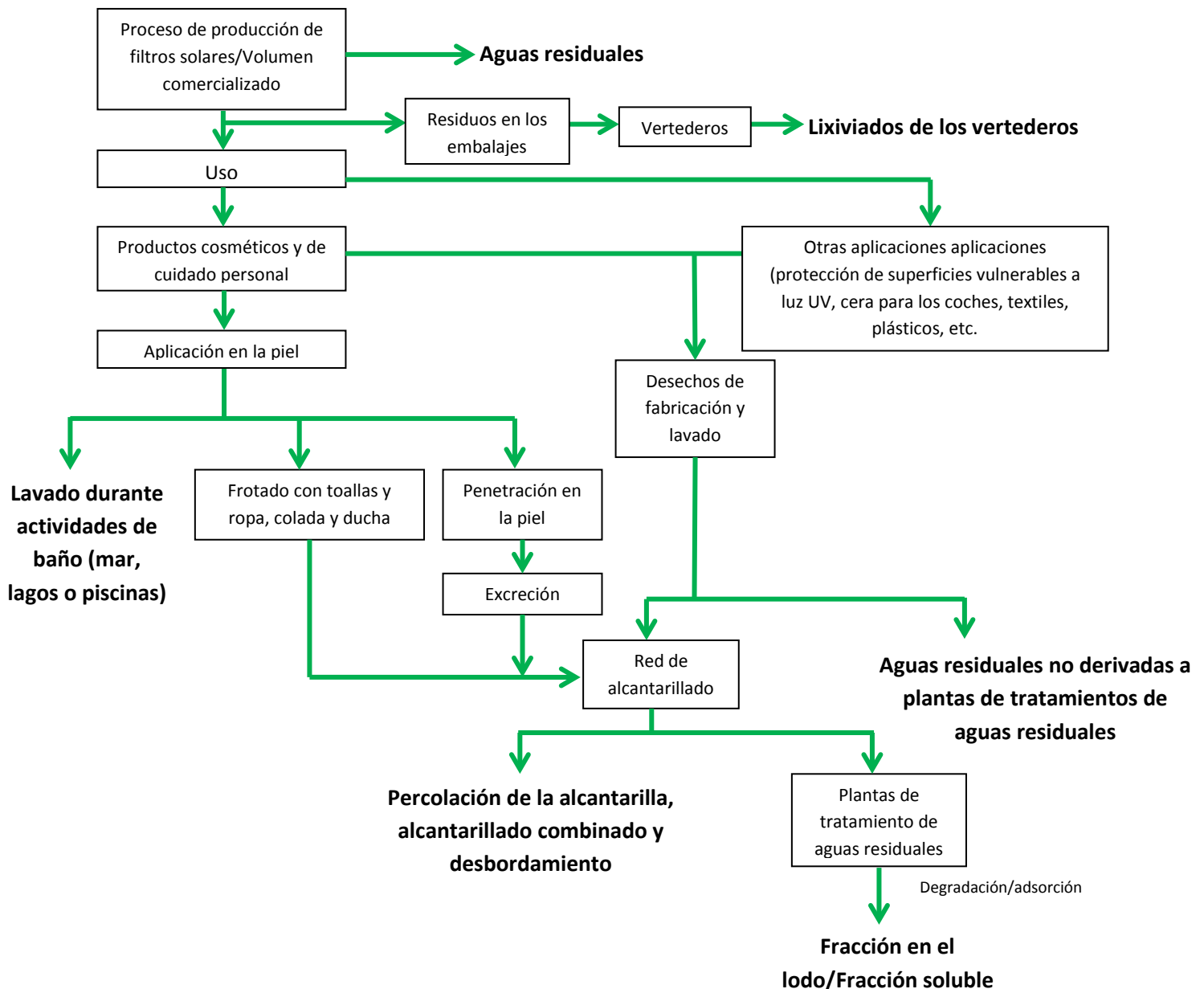


Figura 1. Las principales vías de llegada de los filtros UV al medio ambiente. (Adaptado de Giokas et al., 2007)

A esta excesiva acumulación de filtros solares recientemente se le ha sumado una nueva preocupación, el efecto nocivo que presentan algunos de ellos tanto sobre el ser humano, como sobre otros organismos acuáticos. En la actualidad ya existen gran número de estudios sobre el efecto tóxico de los filtros solares inorgánicos sobre distintas especies (Farkas et al., 2015; Fouqueray et al., 2012; Minetto et al., 2014; Rocco et al., 2015; Xia et al., 2015), pero aún se está empezando a conocer la posible toxicidad de algunos filtros UV orgánicos (Blüthgen et al., 2014; Danovaro et al., 2008; Gao et al., 2013; Rodil et al., 2009; Tsui et al., 2014).

Objetivo

Para entender mejor el riesgo asociado con filtros solares en el ambiente es necesario llevar a cabo estudios sobre la posible toxicidad que estos presentan, no solo de forma individual, sino también de forma combinada. La escasez de este tipo de estudios y la necesidad de conocimiento sobre la posible toxicidad de algunos filtros solares orgánicos sobre microorganismos marinos ha sido el principal incentivo para realizar este trabajo.

El objetivo consiste en la evaluación del posible efecto tóxico de dos de los filtros solares químicos orgánicos más utilizados en la formulación de cremas solares, Benzofenona-3 (BP-3) y Octocrileno (OC), sobre la microalga marina *Tetraselmis suecica* (Kyllin) Butch.

Con este trabajo se pretende conocer el posible efecto tóxico del octocrileno sobre *T. suecica* y la posible interacción entre ambos filtros solares orgánicos. Para ello se va a evaluar su efecto sobre el crecimiento, la composición de pigmentos y la actividad celular.

Materiales y Métodos

- **Descripción de la especie de microalga utilizada**

La especie elegida para el estudio de la posible toxicidad de los filtros solares fue *Tetraselmis suecica* (Kyllin) Butch.

Tetraselmis suecica es una especie de microalga marina perteneciente a la familia *Chlorodendraceae*, que se encuentra dentro del orden *Chlorodendrales*, la clase *Prasinophyceae* y la división *Chlorophyta*.

Son células verdes, debido a la presencia de clorofila a y b, y con forma ovoide y unas dimensiones aproximadas entre 9-11µm x 7-8µm x 4,5-6µm. Presentan cuatro flagelos que salen de una especie de invaginación en el ápice anterior de la célula, de tal forma que están ubicadas en la misma dirección en la que avanza. Normalmente en la el extremo posterior hay un estigma (Van den Hoek et al., 1995).

Mediante microscopio electrónico se puede observar que el flagelo está rodeado de dos capas con una serie de pelos tubulares quebradizos que se liberan con cierta facilidad. El núcleo es grande y central, y el cloroplasto presenta 4 lobulaciones, y en su parte basal se encuentra un pirenoide rodeado de almidón. El cuerpo está rodeado de una teca formada por una serie de escamas cementadas sintetizadas y secretadas por el aparato de Golgi (Van den Hoek et al., 1995).

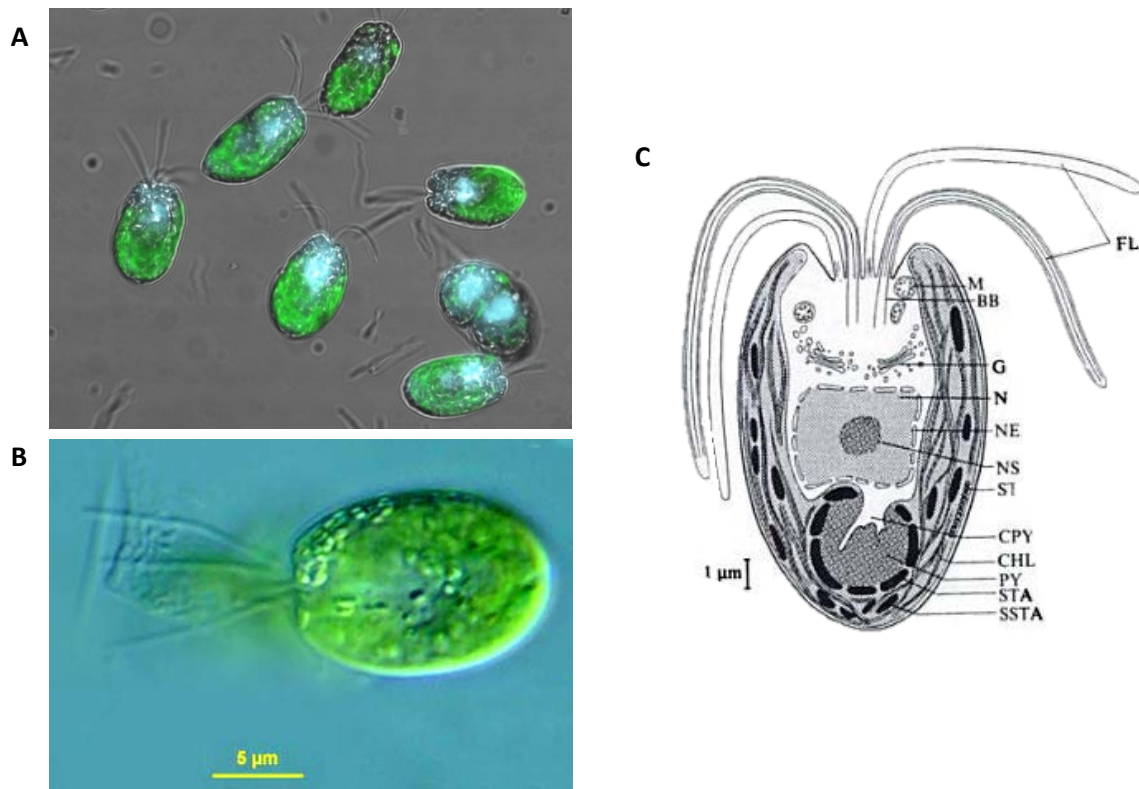


Imagen 1. Microfotografías (A y B) y sección longitudinal (C) de *Tetraselmis suecica* (Kyllin) Butch.

BB= cuerpo basal; CHL= cloroplasto; CPY= Canal citoplasmático con el pirenoide; FL= flagelo; G= Aparato de Golgi; M= mitocondria; N= núcleo; NE= envoltura nuclear; NS= nucléolo; PY= pirenoide; SSTA= acumulación de almidón; STA= grano de almidon paralelo al pirenoide.

T. suecica tiene una gran importancia comercial porque es muy utilizada como alimento vivo para peces, crustáceos (Fábregas et al., 1996) y larvas de moluscos. Además de esta utilidad, su fácil cultivo y manipulación permite su uso para la producción de metabolitos de interés comercial, como por ejemplo el biodiesel (Chini Zittelli et al., 2006; Rodolfi et al., 2009). La sensibilidad de esta especie a la toxicidad ejercida por contaminantes acuáticos, como los antibióticos, también ha sido estudiada (Seoane et al., 2014).

- **Descripción de los dos filtros solares químicos**

Los filtros solares escogidos para este estudio son Octocrileno (OC) y Benzofenona-3 (BP-3).

El Octocrileno (OC) o 2-etilhexilo 2-ciano-3,3-difenil-2-propenoato es un filtro solar orgánico que pertenece a la familia de los cinamatos. Es un éster formado por la condensación de un difenilcianoacrilato con 2-etilhexanol (Avenel-Audran et al., 2010).

Proporciona protección frente la radiación UV-B, así como frente a las longitudes de onda más cortas de la UV-A, lo que han contribuido a su uso generalizado en los protectores solares y preparaciones cosméticas durante los últimos 10 años (Karlsson et al., 2012). Se considera altamente fotoestable y también ha sido sugerido para estabilizar otros filtros UV de la fotodegradación (Scalia & Mezzena, 2009).

En la **Tabla 1** se puede ver tanto su estructura como algunas de sus propiedades. Presenta un coeficiente de reparto octanol-agua alto (**Tabla 1**), lo cual indica que es poco soluble en agua, lo que significa que no es probable que se encuentre precipitado en los sedimentos que adherido a la biota o a partículas en suspensión (Ramos et al., 2015).

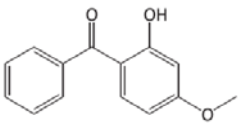
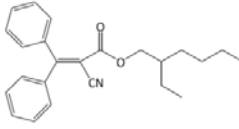
Nombre ^a	Estructura química ^b	Fórmula química ^b	Peso molecular (g·mol ⁻¹) ^a	Solubilidad (g·L ⁻¹) ^a	Log K _{ow} ^a	número CAS ^a	% permitido en productos cosméticos ^c
Benzofenona-3 (BP-3)		C ₁₄ H ₁₂ O ₃	228,24	0,10	3,79	131-57-7	10%
Octocrileno (OC)		C ₂₄ H ₂₇ NO ₂	361,49	3,6 × 10 ⁻⁴	6,88	6197-30-4	10% (como ácido)

Tabla 1. Características de los dos filtros solares utilizados en este trabajo.

^a (Gago-Ferrero et al., 2012).

^b (Ramos et al., 2015).

^c (EC) No 1223/2009

La Benzofenona-3 (BP-3), también conocida como 2-hidroxi-4-metoxibenzofenona u oxibenzona es uno de los filtros solares más utilizados en los protectores solares y cosméticos (Emonet et al., 2001). Pertenece a las benzofenonas, una clase de las cetonas aromáticas. Está formada por dos anillos de benceno unidos por un grupo carbonilo y puede absorber tanto la radiación UV-A (315-400 nm) como la UV-B (280-315 nm).

Al igual que con otros filtros UV orgánicos, BP-3 es un compuesto fotoestable, lipófilo y potencialmente bioacumulativo (Tovar-Sánchez et al., 2013). Debido a esta naturaleza lipofílica, que viene apoyada por su alto coeficiente de reparto octanol-agua (K_{ow})(**Tabla 1**), cuando se encuentra en medio acuoso tiende a acumularse en la interfase agua-aire, a adherirse a las partículas en suspensión o ser adsorbida por la biota (Kim & Choi, 2014).

Existen casos en los que la BP-3 provoca reacciones alérgicas (Emonet et al., 2001) y también puede provocar alteraciones endocrinas en diferentes clases de organismos, principalmente a nivel de estrógenos, pero también en diferentes objetivos hormonales (Kim & Choi, 2014; Rodríguez-Fuentes et al., 2015). Además, en el laboratorio de Microbiología en el que se realizó el presente trabajo, se ha comprobado el efecto tóxico de este compuesto sobre *T. suecica* (datos no publicados).

- **Cultivo microalgal**

T. suecica se cultiva en agua de mar que se esteriliza previamente en autoclave a 120 °C durante 20 minutos. La fuente de nutrientes utilizada es el medio Algal-1 que se prepara a mediante la disolución en agua destilada de una mezcla de macroelementos, fundamentalmente N y P, y otra de oligoelementos. Este medio también se esteriliza en autoclave de igual forma que el agua de mar.

Una vez esterilizados los dos medios se mezclan en asepsia con una relación de 10mL de Algal-1 por cada 1L de agua de mar.

Inicialmente se hace un cultivo en botellas *Pyrex* de 1L al que se añade el inóculo adecuado de microalgas y se mantiene en la cámara de cultivo bajo unas condiciones controladas de temperatura e iluminación durante un fin de semana.

La temperatura de la cámara de cultivo se es constante a 18±1 °C y la iluminación artificial se aplica en ciclos de 12h de luz y 12 de oscuridad, con una intensidad de 68,25μmol fotón·m⁻²·s⁻¹ proporcionada por tubos fluorescentes Philips TLD de 36 W. El aire inyectado a los cultivos es filtrado mediante filtros *Millipore FG* de 0,20μm de tamaño de poro para evitar la contaminación del cultivo.

- **Recuento celular y cálculo de la tasa de crecimiento (μ)**

La densidad celular se determinó mediante el recuento celular directo al microscopio, utilizando una cámara Neubauer y un microscopio óptico de contraste de fases NIKON Labophot con un objetivo de 40x. Se toma una muestra de cada tubo y se fija las células con Lugol, para evitar que se muevan sin llegar a romper las células, ya que son flageladas. En el caso de que haya muestras muy concentradas se realizan las diluciones necesarias para que el recuento se encuentre entre 30 y 300 células por cuadrante.

A partir de estos datos se calcula la tasa de crecimiento (μ) para el tiempo de 48h y de 96h utilizando la siguiente ecuación:

$$\mu = [\ln(N_f) - \ln(N_0)] / \ln 2 (t_f - t_0)$$

En esta fórmula μ representa la tasa de crecimiento que se expresa en días⁻¹. (t₀) y (t_f) son respectivamente el tiempo inicial y final del periodo estudiado y ambos son expresados en días. (N_f) y (N₀) representan la densidad celular (células·ml⁻¹) en dichos tiempos.

- **Determinación de pigmentos mediante espectrofotometría**

Para la determinación de pigmentos se retira un volumen de igual de todos los cultivos y se centrifuga a 4500rpm durante 15min a 4°C utilizando la centrífuga refrigerada ALC PK121R.

Tras esto se retira el sobrenadante con una pipeta Pasteur conectada a una bomba de vaciado y el pellet de células se resuspende en una solución de acetona-metanol en una proporción 2:1. Este se mantiene a 4°C un mínimo de 24h y tras esto se realiza una sonicación breve de cada tubo para asegurar la completa extracción de los pigmentos. Pasado este tiempo se centrifugan nuevamente y esta vez se recoge el sobrenadante que contiene los pigmentos, descartando los restos celulares.

Utilizando un espectrofotómetro Shimadzu UV- 1700, se mide la absorbancia a tres longitudes de onda, 664, 647 y 480nm, utilizando como blanco la solución acetona-metanol (2:1).

El solvente utilizado es acetona metanol (2:1) porque es el requerido para la aplicación de las ecuaciones propuestas por Jeffrey & Humphrey (1975) para las clorofilas y los carotenos en microalgas.

Estas ecuaciones son las utilizadas para el cálculo de las concentraciones de pigmentos extraídos de cada muestra:

$$\text{Clorofila } a = 11,93 A_{664} - 1,93 A_{647}$$

$$\text{Clorofila } b = 20,36 A_{647} - 5,5 A_{664}$$

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

A664, A647 y A480 representan las absorbancias (D.O = log I₀/I) medidas a 664, 647 y 480nm, respectivamente y la concentración de cada pigmento es expresada en µg·mL⁻¹.

- **Estudio de la actividad celular basada en la hidrólisis de FDA**

Uno de los métodos más utilizados para la determinación de la actividad celular es el ensayo de hidrólisis de diacetato de fluoresceína.

El diacetato de fluoresceína (Fluorescein Diacetate, FDA) es una molécula no fluorescente, lipofílica y no polar, lo que le permite que difunda libremente a través de las membranas celulares. Una vez dentro de la célula, esterasas no específicas rompen la molécula de FDA dando lugar a dos acetatos y a una molécula de fluoresceína que es fluorescente. Al contrario que el FDA, la fluoresceína es polar e hidrofílica, lo que dificulta su paso a través de la membrana celular, quedando atrapada en el interior de las células que presentan integridad de la membrana celular. Por lo tanto la intensidad de fluorescencia va a aumentar con el tiempo dependiendo de la actividad metabólica de las esterasas de cada cultivo (Prado et al., 2009).

El estudio de actividad esterasa se realizó mediante un ensayo espectrofotométrico a las 96h de exposición de la microalga a los filtros solares utilizando el método propuesto por (Schnurer & Rosswall, 1982).

Se extraen alícuotas de cada una de las réplicas de las experiencias. La solución stock de FDA utilizada estaba en una concentración de $2,5\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ y se añadió a las alícuotas (4mL) de cada uno de las réplicas para alcanzar una concentración final de $25\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$. A una de las dos alícuotas de cada tubo se le añade acetona para obtener una concentración final del 50% para detener la reacción esterasa y además para extraer la fluoresceína del interior celular.

La otra alícuota de cada experiencia se incuba durante 2h 45min en la cámara de cultivo con las mismas condiciones en las que se realizó el cultivo celular. Tras este tiempo se añade acetona de la misma forma que se ha mencionado anteriormente.

Una vez pasado el tiempo suficiente para que se produzca la extracción se mide la concentración de fluoresceína mediante su absorbancia medida a 490nm en un espectrofotómetro Shimadzu UV-1700 utilizando como blanco acetona-agua 1:1.

A partir de los datos obtenidos de las absorbancias se calcula la concentración de fluoresceína mediante la ecuación de una recta de calibrado previamente hecha, con concentraciones de fluoresceína entre 0,5 y $5\mu\text{g}/\text{mL}$.

La escasez de fluoresceína, en células viables con la membrana celular intacta, indicaría efectos tóxicos sobre la actividad de las esterases, las cuales son enzimas esenciales para el funcionamiento normal de la célula (Dorsey et al., 1989). Esta relación entre la actividad esterasa y la cantidad de fluoresceína hace que este ensayo sea muy útil para el control del posible efecto de contaminantes, en nuestro caso los filtros solares, sobre la actividad celular de una microalga, como ya hicieron anteriormente Adam & Duncan (2001) y Ramírez-Fuentes & Trujillo-Tapia (2012) en sus respectivos estudios.

- **Diseño experimental**

Tras este cultivo inicial se realizan cultivos de *T. suecica* expuesta a distintas concentraciones de los filtros solares y también se mantiene muestras sin ellos que actúan como control. De cada una de las experiencias se hacen tres réplicas. Estas experiencias tienen una duración de hasta 144h y se realizan en tubos de cristal *Kimax* que se van a cultivar en la cámara de cultivo con las mismas condiciones de luz y temperatura citadas anteriormente, pero sin aireación.

Cada uno de estos tubos tiene un volumen inicial de 40mL con una densidad celular inicial de $5\cdot 10^5\text{celulas}\cdot\text{mL}^{-1}$.

Las concentraciones de los dos filtros solares utilizadas en el trabajo van a ser diversas. En un primer experimento se utilizan varias concentraciones de Octocrileno (2,5, 5, 7,5 y 10mg·L⁻¹), para observar qué efecto puede presentar éste sobre la microalga. En el segundo experimento además de los controles sin filtro solar (uno solo con inóculo microalgal, y otro con la concentración máxima utilizada de metanol, equivalente al volumen de metanol en el tratamiento de la mezcla), se realiza un tratamiento con Octocrileno, otro con Benzofenona-3 y uno último con la mezcla de los dos filtros solares. En este tratamiento se utiliza una concentración intermedia de Octocrileno, 5mg·L⁻¹, y una concentración igual de Benzofenona-3, también 5mg·L⁻¹, tanto en la mezcla como de forma individual. La concentración de BP-3 elegida fue esa porque se buscó una concentración que hiciera efecto en *T. suecica*, y, como ya se había demostrado mediante ensayos realizados en este laboratorio (datos no publicados), la EC₅₀= 1mg·L⁻¹

Dichas concentraciones se obtienen de soluciones stock. La solución stock de Octocrileno es de 1mg·mL⁻¹ y está disuelta en metanol. En cambio la solución stock de Benzofenona-3 es de 0,5mg·mL⁻¹ y está disuelta en agua-metanol en una proporción 1:1.

El recuento celular de *T.suecica* se hace de todos los cultivos de cada experiencia en un intervalo de 24h, mientras que el análisis de pigmentos se realiza a las 0, 48 y 96h, calculando la concentración de clorofila *a*, *b* y carotenoides. El ensayo de la actividad celular mediante hidrólisis de diacetato de fluoresceína se realiza en los dos experimentos a las 96h de exposición a los filtros solares.

- **Análisis estadísticos**

De todos los datos obtenidos se calculó la media de las tres réplicas y la desviación estándar para cada uno de los tratamientos y sus respectivos controles.

El análisis estadístico se realizó con el programa IBM SPSS Statistic versión 20.0.0.

Para determinar si el OC o la BP-3 tienen un efecto significativo sobre el crecimiento de la microalga se realizó un test ANOVA de un solo factor con un nivel de confianza del 95%. Este mismo test se utilizó también para comparar los datos de las concentraciones de pigmentos en los distintos tratamientos y de concentración de fluoresceína para medir la actividad celular.

Cuando el test ANOVA sale significativo ($p < 0,05$), se rechaza la hipótesis de igualdad de medias, y se utiliza el test de rango múltiple de Tukey para determinar de qué forma afecta cada concentración de filtro solar al parámetro estudiado. El nivel de significación utilizado en este test es siempre de 0,05.

Las representaciones gráficas de los distintos parámetros se han realizado utilizando el programa de análisis estadístico y de gráficas avanzadas SigmaPlot versión 12.0.

Resultados y Discusión

Experimento 1

- Densidad y crecimiento celular

El primer experimento realizado dentro de este trabajo, tenía como objetivo observar el posible efecto del Octocrileno (OC) sobre *T.suecica*.

Las células de la microalga se sometieron a varias concentraciones de OC (2,5, 5, 7,5 y 10mg·L⁻¹). Además se preparó un cultivo control en el que se añadió metanol, un volumen correspondiente a la cantidad máxima a la que estuvieron expuestas as células (10mg·L⁻¹).

En la **Tabla 2** se muestran las densidades celulares de *T. suecica* a las 48h, 96h y al final del tratamiento (144h). Al comparar las densidades entre el control y los distintos tratamientos se observa que no hay diferencias significativas.

Las concentraciones más altas de Octocrileno mantienen una densidad celular muy próxima a la del control, mientras que el único tratamiento que varía es el de la concentración más baja. En la concentración de 2,5 mg·L⁻¹ se observa la densidad más alta de todos los tratamientos en los tres tiempos de medida, pero aun así, esta no presenta diferencias significativas con respecto al control.

Tratamiento	Densidad de población		
	48h	96h	144h
Control + metanol	7,18 ± 0,58	8,53 ± 0,20	33,60 ± 7,54
Octocrileno 2,5	7,73 ± 0,29	11,09 ± 1,35	42,02 ± 3,45
Octocrileno 5	6,62 ± 0,58	10,27 ± 2,51	35,65 ± 4,85
Octocrileno 7,5	7,25 ± 1,39	9,61 ± 1,25	31,87± 4,22
Octocrileno 10	6,51 ± 0,67	8,85 ± 0,49	31,92 ± 3,57

Tabla 2. Densidades celulares de los cultivos a diferentes concentraciones de OC (mg·L⁻¹) obtenidas a las 48, 96 y 144 horas. Los valores representados se corresponden con la media de las tres réplicas de cada tratamiento ± y la desviación estándar y se expresan en 10⁵células·mL⁻¹.

En lo referente a la tasa de crecimiento en ninguno de los tres tiempos, mostrados en la **Tabla 3**, se observan diferencias significativas en la tasa de crecimiento. Los valores obtenidos de los cultivos tratados con las distintas concentraciones de Octocrileno al final del experimento (144h) se encuentran entre 0,382 ± 0,027 días⁻¹ y 0,440 ± 0,016 días⁻¹, valores muy próximos a la tasa de crecimiento de la muestra control (0,391 ± 0,050 días⁻¹).

Tratamiento	Tasa de crecimiento (días ⁻¹)		
	48h	96h	144h
Control + metanol	0,267 ± 0,057	0,196 ± 0,009	0,391 ± 0,050
Octocrileno 2,5	0,321 ± 0,027	0,289 ± 0,043	0,440 ± 0,016
Octocrileno 5	0,207 ± 0,062	0,256 ± 0,086	0,405 ± 0,029
Octocrileno 7,5	0,268 ± 0,134	0,237 ± 0,049	0,382 ± 0,027
Octocrileno 10	0,195 ± 0,076	0,209 ± 0,019	0,386 ± 0,023

Tabla 3. Tasas de crecimiento de los cultivos a diferentes concentraciones de OC (mg·L⁻¹) a las 48, 96 y 144 horas. Los valores representados se corresponden con la media de las tres réplicas de cada tratamiento ± y la desviación estándar.

El crecimiento celular es uno de los parámetros más utilizados para observar el efecto tóxico de un compuesto sobre un microorganismo, como demostró Radix et al. (2000) en su estudio, en el que compararon tres tipos de pruebas de toxicidad en microalgas y otros organismos y determinaron que la evaluación del crecimiento microalgal resultó ser el tipo de test más sensible.

En este trabajo, al igual que ha hecho muchos otros (Paredes et al., 2014; Rodil et al., 2009; Sieratowicz et al., 2011; Tovar-Sánchez et al., 2013), se determina la toxicidad ejercida por un compuesto, en nuestro caso OC, BP-3 y la mezcla, en función de la reducción de la tasa de crecimiento o de la biomasa final, en relación a un control.

La ausencia de diferencias significativas en el crecimiento celular en presencia de Octocrileno demuestra que el OC no presenta efecto, al menos a las concentraciones ensayadas, sobre el crecimiento celular de la microalga *Tetrasemis suecica*, apoyando los resultados obtenidos en otros artículos realizados en distintas especies de microalgas (Kaiser et al., 2012; Rodil et al., 2009; Tovar-Sánchez et al., 2013) y protozoos (Gao et al., 2013).

Experimento 2

• Crecimiento celular

El segundo experimento se realizó con el fin de observar el posible efecto tóxico conjunto del filtro solar utilizado en el primer experimento, Octocrileno, y otro filtro solar químico muy común, la Benzofenona-3, que inhibe el crecimiento de *T. suecica*.

Los resultados obtenidos en este experimento se recogen en la **Figura 2**, dónde se representa la densidad celular de cada una de las experiencias ensayadas frente al tiempo.

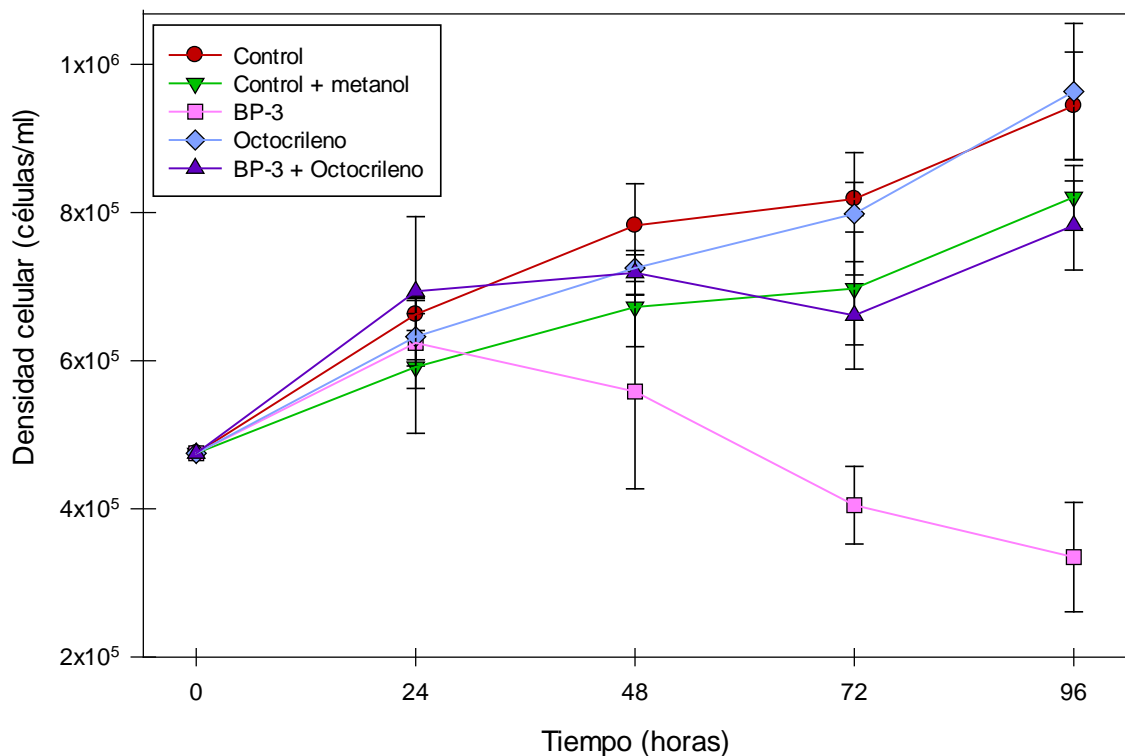


Figura 2. Curvas de crecimiento de los cultivos de *T. suecica* en las distintas condiciones. Control: ausencia de fármaco; Control + metanol: ausencia de fármaco y con metanol; BP-3: Benzofenona-3 concentración 5 mg·L⁻¹; Octocrileno: Octocrileno concentración 5 mg·L⁻¹; BP-3 + Octocrileno: Benzofenona-3 y Octocrileno ambos a concentración final de 5 mg·L⁻¹.

Los valores representados se corresponden con la media de tres réplicas de cada tratamiento ± la desviación estándar.

Partiendo de una densidad celular inicial de $4,75 \cdot 10^5$ células·mL⁻¹ durante las primeras 24 horas todas las muestras presentan un crecimiento exponencial alcanzando densidades poblacionales entre $5,92 \cdot 10^5$ y $6,94 \cdot 10^5$ células·mL⁻¹.

El cultivo control continúa con una curva de crecimiento normal llegando a alcanzar una densidad final de $9,44 \cdot 10^5$ células·mL⁻¹. La curva de crecimiento del control con metanol es prácticamente paralela a la del Control sin metanol, pero con densidades celulares más bajas. Esto indica que el metanol afecta en cierta medida negativamente sobre el crecimiento celular, pero sin llegar a ocasionar diferencias significativas con el control sin metanol.

Es a partir de estas 48h cuando se empiezan a diferenciar las dos vías de respuesta frente a la acción de los filtros solares. Por un lado está el tratamiento con Benzofenona-3 en el que se observa que el número de células desciende incluso a niveles más bajos que los iniciales.

Y por el otro se encuentra la muestra de Octocrileno y la de la combinación de los dos filtros solares, que no presentan diferencias significativas con respecto a la curva de crecimiento normal de *Tetraselmis suecica*.

Tratamientos	Tasa de crecimiento (días ⁻¹)		
	48h	96h	144h
Control	0,359 ± 0,053	0,247 ± 0,028	0,171 ± 0,020
Control + metanol	0,249 ± 0,026	0,197 ± 0,018	0,167 ± 0,010
Benzophenone-3	0,102 ± 0,179	-0,132 ± 0,086 ***	-0,210 ± 0,028 ***
Octocrileno	0,305 ± 0,018	0,254 ± 0,037	0,155 ± 0,014
Octocrileno + BP-3	0,298 ± 0,030	0,179 ± 0,028	0,166 ± 0,006

Tabla 4. Tasas de crecimiento de los cultivos a diferentes concentraciones de OC (mg·L⁻¹) a las 48, 96 y 144 horas. Los valores representados se corresponden con la media de las tres réplicas de cada tratamiento ± y la desviación estándar.

Significación: * = $p < 0.05$, ** = $p < 0.01$ o *** = $p < 0.001$.

Al observar los datos de la tasa de crecimiento se ve que el crecimiento hasta las 48h es muy semejante en todos los tratamientos, sin llegar a existir diferencias significativas. Pero a partir de ese momento ya se ve que no hay diferencias significativas en la tasa de crecimiento de los tratamientos, excepto en la muestra tratada con Benzophenone-3.

Además, la Benzophenone-3 afecta tan significativamente al crecimiento de la microalga, que la tasa de crecimiento llega a ser negativa (hay muerte celular).

Al igual que lo observado en las curvas de crecimiento el Control positivo y los tratamientos con Octocrileno y la mezcla de OC y BP-3 no presentan diferencias significativas con respecto al Control negativo en la tasa de crecimiento a lo largo de toda la duración del experimento.

Comparando los datos de las curvas y de las tasas de crecimiento se puede concluir que la Benzofenona-3 presenta un efecto inhibitorio sobre el crecimiento celular de *Tetraselmis suecica*. Esta es la respuesta esperada ya que en varios artículos se recoge este efecto sobre distintos microorganismos (Gao et al., 2013; Rodil et al., 2009; Sieratowicz et al., 2011; Tovar-Sánchez et al., 2013) y, además, se demostró en el laboratorio de Microbiología en el que se realizó este trabajo (datos no publicados) sobre la propia *T. suecica*, obteniendo una $EC_{50}=1\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$.

Además, como ya se esperaba encontrar, basándose en los datos obtenidos en el primer experimento, el Octocrileno no afecta al crecimiento celular.

El dato más relevante de este experimento es el del tratamiento expuesto a la combinación de Octocrileno y Benzofenona-3. Tanto la curva de crecimiento como la tasa presentan valores muy semejantes a los del control, lo que significa que la mezcla de filtros solares no actúa sinérgicamente ya que no hay efecto tóxico. Una posible explicación sería que el Octocrileno actúe como antagonista de la BP-3, inhibiendo sus efectos sobre el crecimiento celular y permitiendo así que este sea normal.

El problema de la utilización del crecimiento celular como método para la cuantificación del efecto tóxico de un compuesto sobre una microalga es que solamente se tiene en cuenta modificaciones celulares que alteren la viabilidad o la capacidad de división del microorganismo. De esta forma se dejan de lado modificaciones metabólicas o de composición que no repercutan directamente en el crecimiento celular.

Por ello se realizaron también otros análisis como la determinación de pigmentos y de la actividad celular.

- **Determinación de pigmentos**

La concentración de pigmentos celulares, clorofila *a* y carotenoides, medida a las 48 y 96h se representa en la **Figura 3**.

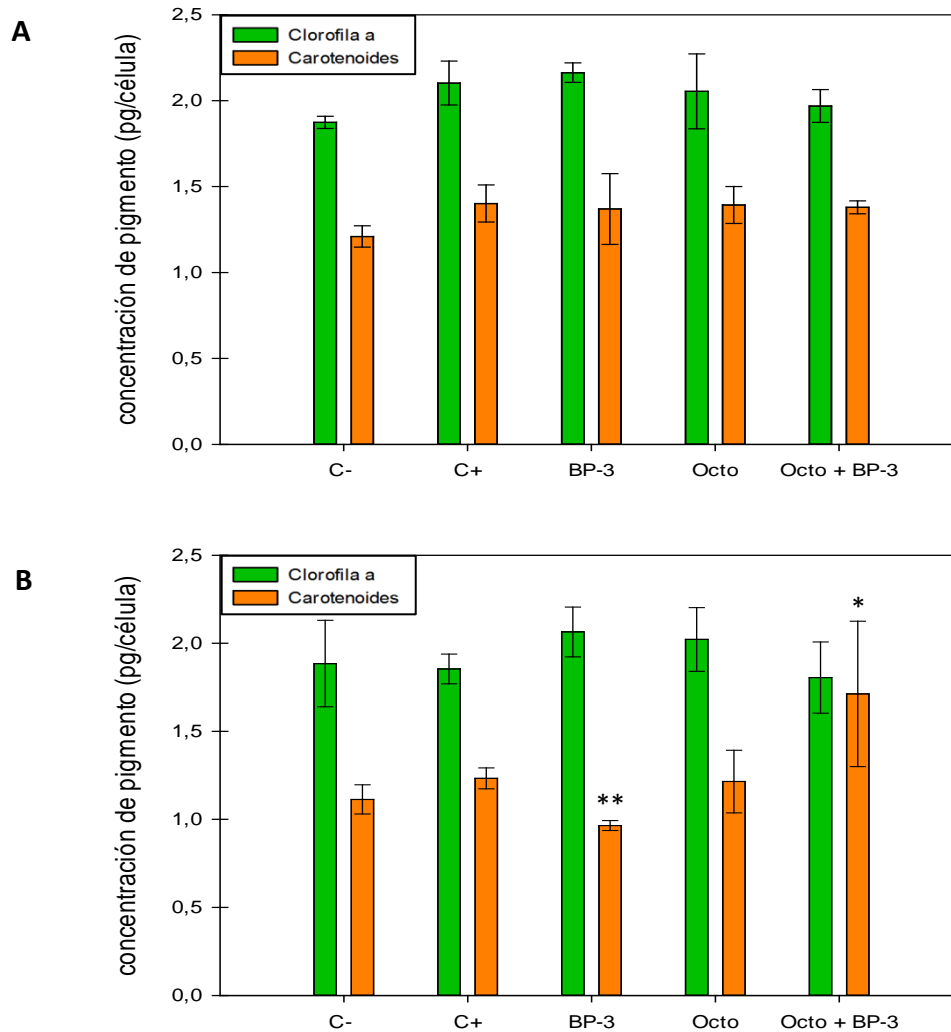


Figura 3. Contenido celular de pigmentos en cada uno de los tratamientos ensayados a las 48h (A) y a las 96h (B). C-: Control negativo; C+ Control con metanol; BP-3: Benzofenona-3 $5 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$; Octo: Octocrileno $5 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$; Octo + Bp-3: Octocrileno y Benzofenona-3 ambos a $5 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$.

Los valores representados se corresponden con la media de tres réplicas de cada tratamiento \pm la desviación estándar.

Significación: * = $p < 0.05$, ** = $p < 0.01$ o *** = $p < 0.001$.

A las 48 horas de exposición a los filtros solares (**Figura 3. A**) no se observan diferencias significativas entre los distintos tratamientos ni en lo referido a la clorofila *a* ni a los carotenos.

Transcurridas otras 48 horas más, a las 96 horas de tratamiento (**Figura 3. B**), continúa sin apreciarse cambios significativos en la clorofila *a* en ninguna de las muestras. Los valores de concentración de clorofila se encuentran entre $2,06 \pm 0,14$ y $1,81 \pm 0,20 \text{ pg}\cdot\text{célula}^{-1}$.

En cambio los carotenos sí que presentan cambios significativos en la muestra tratada con Benzophenone-3 y la tratada con la combinación de BP-3 y Octocrileno., con respecto a los controles negativo y positivo, que presentan una concentración de $1,11 \pm 0,08$ y $1,23 \pm 0,06 \mu\text{g}\cdot\text{célula}^{-1}$ respectivamente.

Por un lado, en la muestra tratada con Benzophenone-3 la cantidad de carotenos es significativamente inferior a los controles. En cambio en la muestra de la mezcla la cantidad de carotenos es significativamente mayor a los controles.

Los pigmentos son piezas muy importantes en la fotosíntesis, uno de los componentes fundamentales del metabolismo energético de este tipo de células, por lo que la cantidad de clorofilas y carotenoides es un gran método de determinación de alteraciones celulares debidas a situaciones de estrés como la exposición a compuestos tóxicos (Hendry & Price, 1993).

Los carotenoides son los encargados de capturar la luz solar y transmitirla a las clorofilas y de la protección del aparato fotosintético frente a daños fotooxidativos. Por ello, la reducción de su presencia causada por la Benzofenona-3 puede significar que esta afecta al aparato fotosintético de las células de *T. suecica*, influyendo en la actividad fotosintética.

El aumento de carotenos en la muestra tratada con la combinación de OC y BP-3 puede deberse a una respuesta protectora frente a condiciones de estrés oxidativo (Baroli et al., 2000) causado por los filtros solares, aunque con los resultados que hemos obtenido no se puede saber exactamente si ésta es la causa.

- **Actividad celular**

El análisis de la actividad esterasa de los distintos tratamientos a las 96h (**Figura 4**) revela que el nivel de actividad metabólica de las células de *T. suecica* se redujo por acción de los filtros solares, tanto el Octocrileno como la Benzofenona-3.

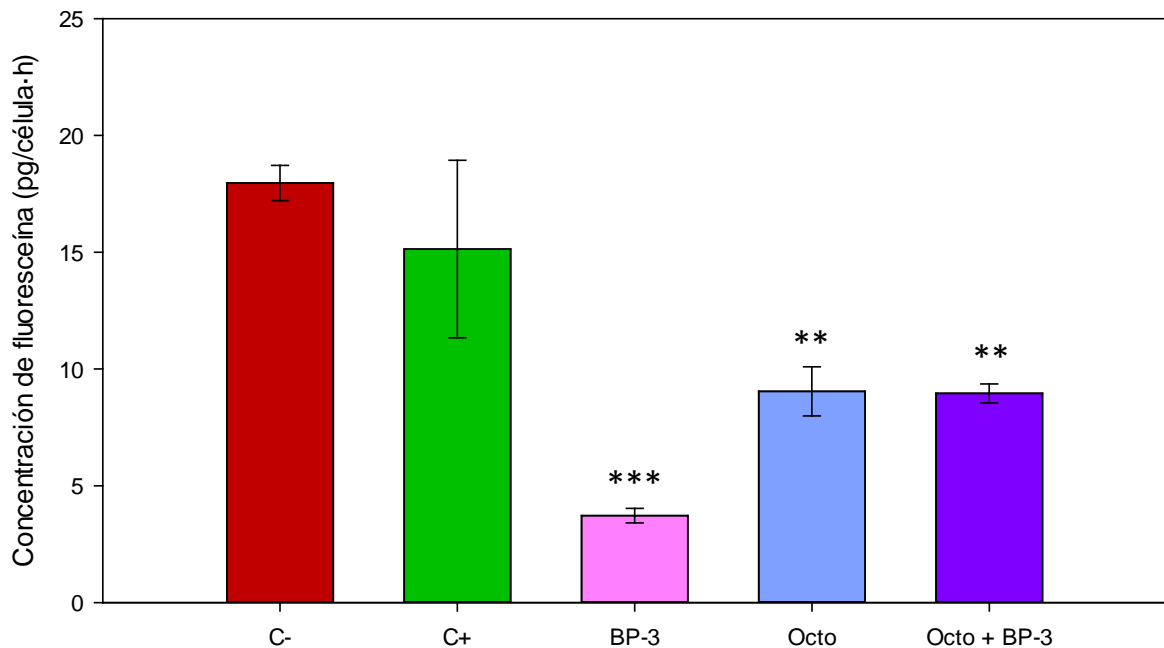


Figura 4. Actividad metabólica celular del cultivo control y de cada uno de los tratamientos medida a las 96 horas. C-: Control negativo; C+ Control con metanol; BP-3: Benzofenona-3 5 mg·L⁻¹; Octo: Octocrileno 5 mg·L⁻¹; Octo + Bp-3: Octocrileno y Benzofenona-3 ambos a 5 mg·L⁻¹.

Los valores representados se corresponden con la media de tres réplicas de cada tratamiento ± la desviación estándar.

Significación: * = $p < 0.05$, ** = $p < 0.01$ o *** = $p < 0.001$.

La actividad celular del control negativo es de $17,96 \pm 0,75 \text{ pg} \cdot \text{célula}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ y la del control positivo (con metanol) es menor pero muy próxima a ella, $15,13 \pm 3,80 \text{ pg} \cdot \text{célula}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$, lo que significa que el metanol afecta en cierta medida a la actividad celular, pero no llega a ser significativo.

La BP-3 es el tratamiento que presenta una actividad más baja $3,72 \pm 0,31 \text{ pg} \cdot \text{célula}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$, con diferencia significativa en relación con los controles. Esto indica que la Benzofenona-3 actúa disminuyendo en gran medida la actividad celular.

Igualmente el tratamiento con Octocrileno y el de la combinación de los dos filtros solares disminuyen significativamente su actividad pero no tan marcadamente como la BP-3.

El Octocrileno en concentración 5 mg·L⁻¹ presenta una reducción significativa de la actividad celular, lo que indica que está afectando negativamente a la actividad celular.

La mezcla también presenta una reducción significativa de la actividad celular, pero su actividad es prácticamente igual a la de Octocrileno.

Estos datos dan a entender que los dos filtros no actúan en sinergia ya que si este fuera el caso, sus efectos se sumarían y la actividad celular se vería aún más disminuida que en la muestra de Benzofenona-3, pudiendo darse el caso de que no se produjera actividad celular.

Tampoco actúan como antagonistas uno del otro, ya que esto provocaría una disminución del efecto tóxico de los dos filtros, desencadenando una disminución menor de la actividad celular, o incluso eliminando su influencia sobre la actividad.

Rechazando estas dos posibilidades, lo que sí que puede producirse es una atenuación del efecto de la Benzofenona-3, ya que solamente se produce la reducción de la actividad propia del Octocrileno.

Estos datos obtenidos apoyan que el ensayo de hidrólisis de diacetato de fluoresceína es un método adecuado en este tipo de estudios para evaluar cambios en la actividad microbiana provocados por el efecto de diferentes contaminantes como ya se había recogido en otras publicaciones relacionadas (Adam & Duncan, 2001; Ramírez-Fuentes & Trujillo-Tapia, 2012).

Conclusiones

Este trabajo evaluó el efecto del filtro solar Octocrileno sobre la microalga marina *Tetraselmis suecica* y también el posible efecto conjunto de este filtro solar junto a otro muy utilizado, la Benzofenona-3. Los datos obtenidos en el primer experimento combinados con los del segundo nos permiten concluir que el Octocrileno no afecta a la viabilidad ni al crecimiento celular de la microalga *T. suecica* a las concentraciones ensayadas (entre 2,5 y 10 mg·L⁻¹) y que tampoco provoca cambios en la actividad fotosintética, ya que la concentración de pigmentos celulares no se ve alterada.

Del segundo experimento también se puede extraer que la Benzofenona-3 presenta los efectos tóxicos sobre *T. suecica* esperados. La BP-3 actúa inhibiendo el crecimiento celular y también tiene un efecto negativo sobre la actividad fotosintética ya que provoca la disminución de la cantidad de carotenoides celulares.

La combinación de los dos filtros solares, OC y BP-3, no produce cambios significativos sobre la tasa y la curva de crecimiento celular, por lo que se puede concluir que, al igual que el Octocrileno solo, no presenta toxicidad relacionada con el crecimiento celular. En lo referente a la actividad fotosintética, esta lo más probable es que no se vea alterada ya que las clorofila *a* permanece en concentraciones próximas al control y los carotenoides, aunque aumentan su concentración a las 96h, puede ser debido a una respuesta protectora frente a estrés oxidativo, aunque no concluyente.

La actividad celular es el análisis que proporciona datos más relevantes del efecto de ambos filtros solares y de su combinación. La BP-3 es la que ejerce un efecto inhibitorio de la actividad celular más fuerte, pero sin llegar a eliminarla por completo, lo que justificaría el efecto inhibitorio del crecimiento ya que no realizaría la actividad metabólica suficiente para llevar a cabo la división celular y mantener su viabilidad. El Octocrileno también provoca una reducción de la actividad celular, pero en menor medida que la BP-3, por lo que no llega a repercutir en el crecimiento celular.

Por otro lado, la combinación de ambos filtros solares ocasiona una disminución de la actividad celular hasta niveles iguales a los alcanzados por acción del Octocrileno. Esto demuestra que la Benzofenona-3 y el Octocrileno no actúan en sinergia y tampoco como antagonistas, si no que puede ser que el OC atenúe los efectos de la BP-3 sobre la actividad celular.

Conclusions

This study has evaluated the effect of UV filter Octocrylene on marine microalgae *Tetraselmis suecica* and also the possible whole effect of this with another UV filter widely used, Benzophenone-3. The data obtained in the first experiment combined with the second experiment, allows us to conclude that the Octocrylene not affect the viability or cell growth of microalgae *T. suecica* at the concentrations tested (2.5 to 10 mg·L⁻¹) and neither causes changes in the photosynthetic activity because pigments cell concentration is not altered.

From second experiment can also extract the Benzophenone-3 has expected toxic effects on *T. suecica*. BP-3 inhibits cell growth and also has a negative effect on the photosynthetic activity because it causes the decrease of the number of cell carotenoids.

The combination of the two UV filters, OC and BP-3, does not cause significant changes on the rate and cell growth curve, so we can conclude that, like Octocrylene alone, doesn't have growth-related toxicity. In relation to the photosynthetic activity, it is likely that it isn't altered because the chlorophyll a concentrations remains near to the control and carotenoids increase in concentration to 96h, that can be due to a protective response to stress oxidative, although it isn't conclusive.

Cellular activity is the analysis that provides the most relevant data about the effect of both UV filters and combination of them. The BP-3 is the one that exerts a stronger inhibitory effect of cellular activity, but without altogether eliminating it, which would justify the growth inhibitory effect because it would not make enough metabolic activity to carry out cell division and stay viable. Octocrylene also causes a reduction of cell activity but less so than BP-3, which fails to affect cell growth.

Furthermore, the combination of both UV filters leads to decreased cellular activity equal to those achieved by the action of Octocrylene levels. This shows that benzophenone-3 and Octocrylene not act in synergy and neither as antagonists, but it may be that the OC mitigate the effects of BP-3 on cell activity.

Bibliografía

- Adam, G., & Duncan, H. (2001). Development of a sensitive and rapid method for the measurement of total microbial activity using fluorescein diacetate (FDA) in a range of soils. *Soil Biology and Biochemistry*, 33(7-8), 943-951.
- Avenel-Audran, M., Dutartre, H., Goossens, A., Jeanmougin, M., Comte, C., Bernier, C., Benkalfate, L., Michel, M., Ferrier-Lebouëdec, M.C., Vigan, M., Bourrain, J.L., Outtas, O., Peyron, J.L., Martin, L. (2010). Octocrylene, an emerging photoallergen. *Archives of Dermatology*, 146(7), 753-757.
- Baroli, I., Niyogi, K. K., Barber, J., & Heifetz, P. (2000). Molecular genetics of xanthophyll-dependent photoprotection in green algae and plants. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 355(1402), 1385-1394.
- Blüthgen, N., Meili, N., Chew, G., Odermatt, A., & Fent, K. (2014). Accumulation and effects of the UV-filter octocrylene in adult and embryonic zebrafish (*danio rerio*). *Science of the Total Environment*, 476-477, 207-217.
- Brausch, J. M., & Rand, G. M. (2011). A review of personal care products in the aquatic environment: Environmental concentrations and toxicity. *Chemosphere*, 82(11), 1518-1532.
- Chini Zittelli, G., Rodolfi, L., Biondi, N., & Tredici, M. R. (2006). Productivity and photosynthetic efficiency of outdoor cultures of *tetraselmis suecica* in annular columns. *Aquaculture*, 261(3), 932-943.
- Danovaro, R., Bongiorno, L., Corinaldesi, C., Giovannelli, D., Damiani, E., Astolfi, P., Greci, L., Pusceddu, A. (2008). Sunscreens cause coral bleaching by promoting viral infections. *Environmental Health Perspectives*, 116(4), 441-447.
- D'Orazio, J., Jarrett, S., Amaro-Ortiz, A., & Scott, T. (2013). UV radiation and the skin. *International Journal of Molecular Sciences*, 14(6), 12222-12248.
- Dorsey, J., Yentsch, C. M., Mayo, S., & McKenna, C. (1989). Rapid analytical technique for the assessment of cell metabolic activity in marine microalgae. *Cytometry*, 10(5), 622-628.
- Emonet, S., Pasche-Koo, F., Perin-Minisini, M., & Hauser, C. (2001). Anaphylaxis to oxybenzone, a frequent constituent of sunscreens. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 107(3), 556-557.
- Fábregas, J., Otero, A., Morales, E., Cordero, B., & Patiño, M. (1996). *Tetraselmis suecica* cultured in different nutrient concentrations varies in nutritional value to artemia. *Aquaculture*, 143(2), 197-204.
- Farkas, J., Bergum, S., Nilsen, E. W., Olsen, A. J., Salaberria, I., Ciesielski, T. M., Baczek, T., Konieczna, L., Salvenmoser, W., Jenssen, B. M. (2015). The impact of TiO₂ nanoparticles on uptake and toxicity of benzo(a)pyrene in the blue mussel (*mytilus edulis*). *Science of the Total Environment*, 511, 469-476.
- Fouqueray, M., Dufils, B., Vollat, B., Chaurand, P., Botta, C., Abacci, K., Labille, J., Rose, J., Garric, J. (2012). Effects of aged TiO₂ nanomaterial from sunscreen on *daphnia magna* exposed by dietary route. *Environmental Pollution*, 163, 55-61.
- Gago-Ferrero, P., Díaz-Cruz, M. S., & Barceló, D. (2012). An overview of UV-absorbing compounds (organic UV filters) in aquatic biota. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 404(9), 2597-2610.
- Gago-Ferrero, P., Mastroianni, N., Díaz-Cruz, M. S., & Barceló, D. (2013). Fully automated determination of nine ultraviolet filters and transformation products in natural waters and wastewaters by on-line solid phase extraction–liquid chromatography–tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, 1294(0), 106-116.

- Gao, L., Yuan, T., Zhou, C., Cheng, P., Bai, Q., Ao, J., Wang, W., Zhang, H. (2013). Effects of four commonly used UV filters on the growth, cell viability and oxidative stress responses of the tetrahymena thermophila. *Chemosphere*, 93(10), 2507-2513.
- Giokas, D. L., Salvador, A., & Chisvert, A. (2007). UV filters: From sunscreens to human body and the environment. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 26(5), 360-374.
- Hendry, G. A. F., & Price, A. H. (1993). Stress indicators: Chlorophylls and carotenoids. In L. Chapman & Hall (Ed.), *Methods in comparative plant ecology*. (pp. 148-152.) Chapman & Hall, London.
- 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. *Biochimie Und Physiologie Der Pflanzen*, 167(2), 191-194.
- Kaiser, D., Sieratowicz, A., Zielke, H., Oetken, M., Hollert, H., & Oehlmann, J. (2012). Ecotoxicological effect characterisation of widely used organic UV filters. *Environmental Pollution*, 163, 84-90.
- Karlsson, I., Persson, E., Mårtensson, J., & Börje, A. (2012). Investigation of the sunscreen octocrylene's interaction with amino acid analogs in the presence of UV radiation. *Photochemistry and Photobiology*, 88(4), 904-912.
- Kim, S., & Choi, K. (2014). Occurrences, toxicities, and ecological risks of benzophenone-3, a common component of organic sunscreen products: A mini-review. *Environment International*, 70, 143-157.
- Kupper, T., Plagellat, C., Brändli, R. C., de Alencastro, L. F., Grandjean, D., & Tarradellas, J. (2006). Fate and removal of polycyclic musks, UV filters and biocides during wastewater treatment. *Water Research*, 40(14), 2603-2612.
- Liu, Y., Ying, G., Shareef, A., & Kookana, R. S. (2012). Occurrence and removal of benzotriazoles and ultraviolet filters in a municipal wastewater treatment plant. *Environmental Pollution*, 165(0), 225-232.
- Minetto, D., Libralato, G., & Volpi Ghirardini, A. (2014). Ecotoxicity of engineered TiO2 nanoparticles to saltwater organisms: An overview. *Environment International*, 66, 18-27.
- Paredes, E., Perez, S., Rodil, R., Quintana, J. B., & Beiras, R. (2014). Ecotoxicological evaluation of four UV filters using marine organisms from different trophic levels *isochrysis galbana*, *mytilus galloprovincialis*, *paracentrotus lividus*, and *siriella armata*. *Chemosphere*, 104, 44-50.
- Prado, R., García, R., Rioboo, C., Herrero, C., Abalde, J., & Cid, A. (2009). Comparison of the sensitivity of different toxicity test endpoints in a microalga exposed to the herbicide paraquat. *Environment International*, 35(2), 240 – 247.
- Radix, P., Leonard, M., Papantoniou, C., Roman, G., Saouter, E., Gallotti-Schmitt, S., Thiebaud, H., Vasseur, P. (2000). Comparison of four chronic toxicity tests using algae, bacteria, and invertebrates assessed with sixteen chemicals. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 47(2), 186-194.
- Ramírez-Fuentes, E., & Trujillo-Tapia, M. N. (2012). La hidrólisis de diacetato de fluoresceína [3', 6'-diacetilfluoresceína]: Un método rápido y eficaz para determinar la actividad microbiana en muestras de suelo contaminado por pesticidas. *Ciencia Y Mar*, 16(47), 31-36.
- Ramos, S., Homem, V., Alves, A., & Santos, L. (2015). Advances in analytical methods and occurrence of organic UV-filters in the environment - A review. *Science of the Total Environment*, 526, 278-311.

- Rocco, L., Santonastaso, M., Mottola, F., Costagliola, D., Suero, T., Pacifico, S., & Stingo, V. (2015). Genotoxicity assessment of TiO₂ nanoparticles in the teleost danio rerio. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, *113*, 223-230.
- Rodil, R., Moeder, M., Altenburger, R., & Schmitt-Jansen, M. (2009). Photostability and phytotoxicity of selected sunscreen agents and their degradation mixtures in water. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, *395*(5), 1513-1524.
- Rodolfi, L., Zittelli, G. C., Bassi, N., Padovani, G., Biondi, N., Bonini, G., & Tredici, M. R. (2009). Microalgae for oil: Strain selection, induction of lipid synthesis and outdoor mass cultivation in a low-cost photobioreactor. *Biotechnology and Bioengineering*, *102*(1), 100-112.
- Rodríguez-Fuentes, G., Sandoval-Gío, J. J., Arroyo-Silva, A., Noreña-Barroso, E., Escalante-Herrera, K. S., & Olvera-Espinosa, F. (2015). Evaluation of the estrogenic and oxidative stress effects of the UV filter 3-benzophenone in zebrafish (danio rerio) eleutheroembryos. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, *115*, 14-18.
- Sánchez Rodríguez, A., Rodrigo Sanz, M., & Betancort Rodríguez, J. R. (2015). Occurrence of eight UV filters in beaches of gran canaria (canary islands). an approach to environmental risk assessment. *Chemosphere*, *131*, 85-90.
- Scalia, S., & Mezzena, M. (2009). Incorporation in lipid microparticles of the UVA filter, butyl methoxydibenzoylmethane combined with the UVB filter, octocrylene: Effect on photostability. *AAPS PharmSciTech*, *10*, 384-390.
- Schnurer, J., & Rosswall, T. (1982). Fluorescein diacetate hydrolysis as a measure of total microbial activity in soil and litter. *Applied and Environmental Microbiology*, *43*(6), 1256-1261.
- Seoane, M., Rioboo, C., Herrero, C., & Cid, A. (2014). Toxicity induced by three antibiotics commonly used in aquaculture on the marine microalga tetraselmis suecica (kylin) butch. *Marine Environmental Research*, *101*, 1-7.
- Sieratowicz, A., Kaiser, D., Behr, M., Oetken, M., & Oehlmann, J. (2011). Acute and chronic toxicity of four frequently used UV filter substances for desmodesmus subspicatus and daphnia magna. *Journal of Environmental Science and Health - Part A Toxic/Hazardous Substances and Environmental Engineering*, *46*(12), 1311-1319.
- Svobodová, A., Psotová, J., & Walterová, D. (2003). Natural phenolics in the prevention of UV-induced skin damage. A review. *Biomedical Papers of the Medical Faculty of the University Palacký, Olomouc, Czechoslovakia*, *147*(2), 137-145.
- (EC) No1223/2009 cts, (2009). Disponible en: http://ec.europa.eu/health/endocrine_disruptors/docs/cosmetic_1223_2009_regulation_en.pdf. Fecha de consulta: 13/6/2015.
- Tovar-Sánchez, A., Sánchez-Quiles, D., Basterretxea, G., Benedé, J. L., Chisvert, A., Salvador, A., Moreno-Garrido, I., Blasco, J. (2013). Sunscreen products as emerging pollutants to coastal waters. *PLoS ONE*, *8*(6)
- Tsui, M. M. P., Leung, H. W., Wai, T. C., Yamashita, N., Taniyasu, S., Liu, W., Lam, P. K. S., Murphy, M. B. (2014). Occurrence, distribution and ecological risk assessment of multiple classes of UV filters in surface waters from different countries. *Water Research*, *67*, 55-65.
- Van den Hoek, C., Mann, D. G., & Jahns, H. M. (1995). *Algae: An introduction to phycology* Cambridge University Press.
- Xia, B., Chen, B., Sun, X., Qu, K., Ma, F., & Du, M. (2015). Interaction of TiO₂ nanoparticles with the marine microalga nitzschia closterium: Growth inhibition, oxidative stress and internalization. *Science of the Total Environment*, *508*, 525-533.

