



UNIVERSIDADE DA CORUÑA

Facultad de Ciencias

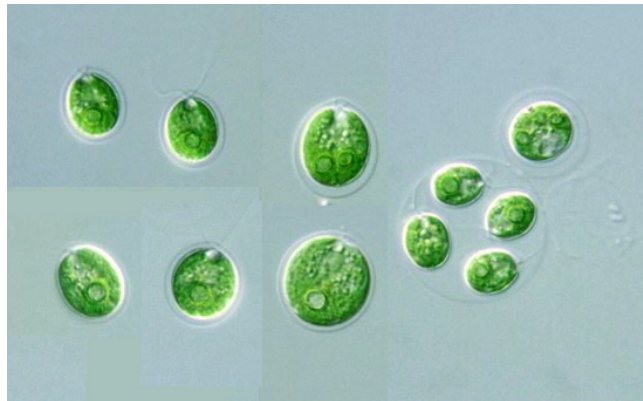
Departamento de Biología Celular, Molecular y Genética

Área de Microbiología

**Efecto del ibuprofeno, un antiinflamatorio no esteroideo, sobre la microalga dulceacuícola *Chlamydomonas reinhardtii* Dangeard**

**Efecto do ibuprofeno, un antiinflamatorio non esteroideo, sobre a microalga doceacuícola *Chlamydomonas reinhardtii* Dangeard**

**Effect of ibuprofen, a nonsteroidal anti-inflammatory drug, on the freshwater microalga *Chlamydomonas reinhardtii* Dangeard**



**Ana Tímermans Camba**

**Trabajo de Fin de Grado**

**27 de Julio de 2016**

**Dirigido por la Dra. Carmen Rioboo Blanco**





UNIVERSIDADE DA CORUÑA

**Facultad de Ciencias**

**Departamento de Biología Celular y Molecular**

**Área de Microbiología**

## TRABAJO DE FIN DE GRADO

Dña. Carmen Rioboo Blanco autoriza la presentación del Trabajo de Fin de Grado “Efecto del ibuprofeno, un antiinflamatorio no esteroideo, sobre la microalga dulceacuícola *Chlamydomonas reinhardtii* Dangeard” presentado por Ana Tímermans Camba para su defensa ante el tribunal calificador.

En A Coruña, a 21 de julio de 2016

Carmen Rioboo Blanco



El presente Trabajo de Fin de Grado ha sido realizado en el Laboratorio de Microbiología del Departamento de Biología Celular, Molecular y Genética de la Universidad de la Coruña, bajo la dirección de la Dra. Carmen Rioboo Blanco, Profesora Contratada Interina de la Universidad de la Facultad de Ciencias de la Universidad de la Coruña.

## ÍNDICE

Resumen/Abstract .....	1
1. Introducción .....	3
2. Objetivos.....	4
3. Material y métodos .....	5
3.1. Descripción de la especie.....	5
3.2. Cultivo microalgal.....	5
3.3. Ibuprofeno.....	6
3.4. Diseño experimental .....	6
3.5. Determinación del crecimiento .....	7
3.5.1. Recuento del número de células.....	7
3.5.2. Tasa de crecimiento .....	7
3.6. Viabilidad celular .....	7
3.7. Determinación espectrofotométrica de clorofila <i>a</i> .....	8
3.8. Determinación del peso seco celular .....	9
3.10. Determinación de la concentración inhibitoria media (IC <sub>50</sub> ).....	9
3.11. Análisis estadístico.....	9
4. Resultados y discusión.....	10
4.1. Tasa de crecimiento.....	10
4.2. Viabilidad celular .....	12
4.3. Contenido celular en clorofila <i>a</i> .....	13
4.4. Peso seco celular .....	16
5. Conclusiones/Conclusions.....	19
6. Bibliografía .....	21
Abreviaturas.....	26

## **Resumen/Abstract**

La presencia de contaminantes emergentes en los ecosistemas acuáticos es actualmente un importante problema ambiental debido a la potencial toxicidad de estos compuestos sobre los organismos acuáticos, especialmente sobre las microalgas. En concreto, el ibuprofeno, uno de los fármacos más utilizado en el mundo, ha sido registrado recientemente en varias masas de agua continentales de la Comunidad de Galicia. En el presente estudio, se han analizado los posibles efectos tóxicos del ibuprofeno sobre la microalga dulceacuícola *Chlamydomonas reinhardtii* Dangeard expuesta a diferentes concentraciones de este fármaco y bajo dos intensidades lumínicas a través del análisis de la tasa de crecimiento, viabilidad celular, contenido celular de clorofila *a* y peso seco celular. Todos los parámetros analizados se vieron significativamente inhibidos ( $p < 0,05$ ) tras 72 h de exposición al ibuprofeno, lo que sugiere que el ibuprofeno ejerce efectos tóxicos sobre las células de *C. reinhardtii*. Además, esta inhibición fue más aguda al incrementarse la intensidad lumínica recibida por las células microalgales. De hecho, los valores obtenidos para las concentraciones inhibitorias medias de ibuprofeno ( $IC_{50}$ ) fueron inferiores en los cultivos microalgales expuestos a la mayor intensidad de luz para todos los parámetros estudiados. Estos resultados sugieren la existencia de una interacción de tipo sinérgico entre los efectos tóxicos provocados por el fármaco ibuprofeno y la intensidad lumínica en las células de la microalga *C. reinhardtii*.

**Palabras clave:** *Chlamydomonas reinhardtii*, ibuprofeno, contaminante emergente, toxicidad, intensidad lumínica, efecto sinérgico.

The presence of emerging contaminants in aquatic ecosystems is currently an important environmental problem due to the potential toxicity of these substances for aquatic organisms, especially for microalgae. Specifically, the ibuprofen, a widely used drug, has been recently detected in several continental water bodies in Galicia. In the present work, the possible toxic effects of ibuprofen in the freshwater microalga *Chlamydomonas reinhardtii* Dangeard to different concentrations of this drug and under two light intensities has been studied using the growth rate, cell viability, cell content of chlorophyll *a* and cell dry weight as analyzed parameters. All these parameters were significantly inhibited ( $p < 0,05$ ) by ibuprofen after 72 h of exposition, suggesting ibuprofen exerts toxic effects in the cells of *C. reinhardtii*. Moreover, this inhibition was higher when the light irradiance over the cultures was increased. In fact, the obtained values for the half maximal inhibitory concentrations of ibuprofen ( $IC_{50}$ ) of all the studied parameters were lower in cultures exposed to the highest intensity. Results suggest the

existence of a synergetic interaction between the toxic effects of ibuprofen and light irradiance in the cells of *C. reinhardtii*.

**Keywords:** *Chlamydomonas reinhardtii*, ibuprofen, emerging contaminant, toxicity, light irradiance, synergetic effect.



## **1. Introducción**

Actualmente, la presencia de contaminantes emergentes en el medio ambiente se ha convertido en objeto prioritario de estudio en el ámbito científico (Matamoros et al., 2016). Los contaminantes emergentes son compuestos persistentes y no biodegradables (Miranda-García et al., 2011) que se han empezado a detectar recientemente en varios ecosistemas, principalmente en los medios acuáticos (Murray et al., 2010), y cuyo potencial efecto tóxico sobre los ecosistemas es aún desconocido (Pal et al., 2014). Dentro de este grupo de contaminantes, se incluyen una amplia variedad de compuestos tales como productos farmacéuticos, de higiene personal, desinfectantes, surfactantes, algunos pesticidas, etc. (Matamoros et al., 2016).

Durante los últimos años, varios estudios han evidenciado la presencia de importantes cantidades de diferentes compuestos farmacéuticos en medios acuáticos (Cleuvers, 2004). Muchos de estos fármacos no son completamente absorbidos en el cuerpo humano y son excretados a través de las heces y la orina como una mezcla de metabolitos y sustancias que pueden estar inalteradas (Moro et al., 2014), parcialmente transformadas o conjugadas con moléculas polares (Heberer, 2001), siendo principalmente descargados a los medios acuáticos a través de las aguas residuales tanto de origen doméstico como industriales. Los fármacos están diseñados de forma que puedan atravesar las membranas biológicas de las células y ejercer su acción en los sistemas celulares, como enzimas o receptores proteicos (Pomati et al., 2004), incluso a bajos niveles y pequeñas concentraciones (Moro et al., 2014). Este hecho hace que se incrementen las probabilidades de que se produzcan efectos no deseados en muchas especies no diana, como consecuencia de la exposición a estos contaminantes en sus hábitats naturales (Moro et al., 2014).

Dentro de estos compuestos farmacéuticos, se encuentra el ibuprofeno, usado ampliamente en todo el mundo tanto en el ámbito de la medicina humana como en el veterinario (Pomati et al., 2004). Su presencia destaca de forma importante en las plantas de tratamiento de aguas residuales. Así mismo, se han encontrado cantidades detectables en varias masas de aguas superficiales y sedimentos de Europa (Winkler et al., 2001). A pesar de que el ibuprofeno presenta una tasa de degradación por oxidación biológica significativa, los riesgos ecológicos también pueden encontrarse en los subproductos que se generan como consecuencia de dicha oxidación, entre los que destaca el hidroxil-ibuprofeno y el carboxil-ibuprofeno. Además, pueden actuar como compuestos persistentes debido a su continua entrada en el medio acuático por su elevada tasa de consumo (Aguirre-Martínez et al., 2015).

Las microalgas son habitantes ubicuos en los medios acuáticos y principales productores en la cadena alimentaria acuática, por lo que es de vital importancia estudiar la posible alteración que el ibuprofeno pueda causar a estos organismos. Por ello, son utilizadas frecuentemente en estudios de toxicidad de aguas contaminadas, ya que son excelentes organismos indicadores de la calidad ambiental debido a su relevancia ecológica, su sensibilidad a un amplio grupo de compuestos, tanto orgánicos como inorgánicos, y por ser fácilmente cultivables en el laboratorio.

Otro aspecto a considerar sobre el potencial efecto de los contaminantes químicos en los ecosistemas acuáticos son los factores ambientales debido a los cambios que se están produciendo a nivel del planeta y particularmente en los ecosistemas acuáticos, como la acidificación de los océanos, la subida de la temperatura media terrestre, el aumento de la salinidad en aguas continentales, etc. Por ello, es de gran interés determinar la posible interacción que se pueda producir, sinérgica o antagónica, entre los contaminantes y otros factores comunes de estrés ambiental, así como sus efectos sobre los organismos acuáticos (Crain et al., 2008; Holmstrup et al., 2010). Debido a que los organismos fotosintéticos, como las microalgas, pueden verse afectados por un incremento de la intensidad lumínica, en el presente trabajo también se estudian las potenciales interacciones que puedan establecerse entre este factor ambiental y los efectos tóxicos provocados por la exposición al ibuprofeno sobre la microalga *Chlamydomonas reinhardtii*.

## **2. Objetivos**

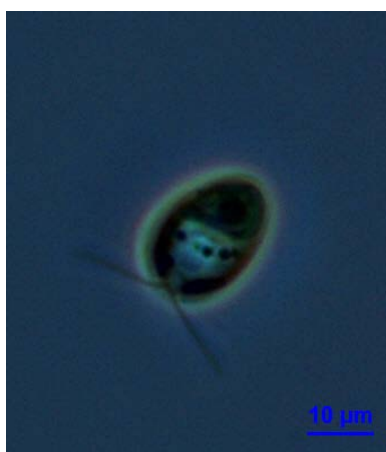
A la vista de lo expuesto, los objetivos del presente trabajo son:

1. Evaluar los posibles efectos del ibuprofeno sobre las células de *C. reinhardtii*, mediante el análisis de cuatro parámetros ampliamente utilizados en ensayos de toxicidad: tasa de crecimiento, viabilidad celular, contenido de clorofila *a* y peso seco celular.
2. Evaluar la posible interacción entre la exposición al ibuprofeno y un incremento en la intensidad lumínica recibida sobre las células de *C. reinhardtii*, mediante el análisis de la tasa de crecimiento, viabilidad celular, contenido de clorofila *a* y peso seco celular.

### **3. Material y métodos**

#### **3.1. Descripción de la especie**

La especie utilizada en este estudio fue la cepa CCAP 11/32A mt+ de *Chlamydomonas reinhardtii* Dangeard (Figura 1), obtenida de la Colección de Cultivos de Algas y Protozoos (CCAP; *Culture Collection of Algae and Protozoa*). Es una microalga dulceacuícola perteneciente a la clase Chlorophyceae, orden Chlamydomonales y familia Chlamydomonadaceae, dentro de la división Chlorophyta.



**Fig. 1.** Célula de *Chlamydomonas reinhardtii*. La imagen fue tomada bajo un microscopio de contraste de fases (NIKON Eclipse E400).

Es una microalga elipsoide, con múltiples mitocondrias en su citoplasma, un único cloroplasto donde almacena su aparato fotosintético (Nickelsen & Kück, 2000) y dos flagelos en posición anterior con los cuales se desplaza y con los que es capaz de percibir su ambiente (Merchant et al., 2007). Presenta una mancha ocular que le permite moverse por fototactismo (Dieckmann, 2003) y pirenoides, estructuras proteicas que contienen la maquinaria de fijación de CO<sub>2</sub> (Villarreal & Renner, 2012).

*C. reinhardtii* se reproduce tanto asexual como sexualmente, habiendo dos tipos celulares sexuales: *mating type* (+) y *mating type* (-) (Sager & Granick, 1954). Para evitar la reproducción sexual durante este estudio, la cepa utilizada de *C. reinhardtii* se corresponde al *mating type* (+) (mt+).

#### **3.2. Cultivo microalgal**

Los cultivos de *C. reinhardtii* se realizan en medio nutritivo Bristol (Brown et al., 1967). Este medio de cultivo se prepara en agua destilada y posteriormente se esteriliza

en autoclave a 120°C durante 20 minutos. A esta mezcla de macronutrientes se le añaden, en condiciones de esterilidad, 3 ml · l<sup>-1</sup> de una solución *stock* de oligoelementos (Fábregas et al., 1984), preparada con 0.5 g de Algal (Nutrición Avanzada S.A.) en 100 ml de agua destilada, que finalmente se autoclava a 120°C durante 20 minutos y se almacena a 4°C.

El cultivo *stock* de *C. reinhardtii* se realiza en botellas *Pyrex* de 1 l, las cuales se mantienen en cámara en condiciones controladas de luz y temperatura, y con aireación constante, insuflando aire atmosférico a 10 l · min<sup>-1</sup> con un turbosoplador, previamente filtrado a través de un filtro de 0,22 µm de diámetro de poro. La iluminación, de 70 µmol fotón m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup>, 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 (ácido 2-(4-isobutilfenil) propanoico) (Figura 2) es un antiinflamatorio no esteroideo, derivado del ácido propanoico y ampliamente utilizado como medicamento analgésico, antirreumático y antipirético (Moro et al., 2014).

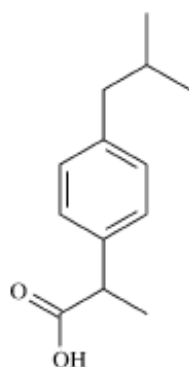


Fig. 2. Estructura molecular del ibuprofeno (modificado de Winkler et al., 2001).

La solución *stock* empleada durante el estudio se prepara a partir de ibuprofeno-sódico comercializado en polvo por Sigma-Aldrich en agua destilada a una concentración de 100 g · l<sup>-1</sup>, y se conserva a temperatura ambiente durante los experimentos.

### 3.4. Diseño experimental

Para evaluar los potenciales efectos del ibuprofeno en las células de *C. reinhardtii*, se preparan cultivos experimentales con cuatro concentraciones diferentes de ibuprofeno: 10, 100, 500 y 1000 mg · l<sup>-1</sup> además de cultivos control libres de fármaco. Los cultivos

experimentales se establecen a partir de un inóculo procedente de un cultivo *stock* microalgal en fase exponencial, y se preparan por duplicado en tubos Áfora con 60 ml de cultivo, a una densidad inicial de  $2 \cdot 10^5$  células  $\cdot$  ml<sup>-1</sup>. Tras 72 h mantenidos en una cámara a las mismas condiciones controladas que el cultivo *stock* y con aireación constante, se toman muestras para llevar a cabo los diferentes análisis.

Con el fin de estudiar la potencial interacción entre el ibuprofeno y un incremento en la intensidad lumínica recibida por los cultivos de *C. reinhardtii*, se llevan a cabo cultivos en paralelo en los cuales la irradiancia lumínica utilizada en la cámara es de 200  $\mu$ mol  $\cdot$  fotón m<sup>-2</sup>  $\cdot$  s<sup>-1</sup>.

Durante este trabajo, los cultivos expuestos a 70  $\mu$ mol fotón m<sup>-2</sup>  $\cdot$  s<sup>-1</sup> se referencian como cultivos expuestos a baja irradiancia (BI), mientras que los cultivos expuestos a 200  $\mu$ mol fotón m<sup>-2</sup>  $\cdot$  s<sup>-1</sup> se referencian como cultivos expuestos a alta irradiancia (AI).

### **3.5. Determinación del crecimiento**

#### **3.5.1. Recuento del número de células**

Para la determinación de la densidad celular (células  $\cdot$  ml<sup>-1</sup>) se retira un volumen conocido de cada uno de los tratamientos y se lleva a cabo el recuento del número de células en una cámara Neubauer *improved*, utilizando un microscopio óptico de contraste de fases (NIKON Eclipse E400).

#### **3.5.2. Tasa de crecimiento**

Se calcula la tasa de crecimiento ( $\mu$ ), para cada concentración de ibuprofeno ensayado, expresada en día<sup>-1</sup>, mediante la siguiente fórmula:

$$\mu = [\ln(N_t) - \ln(N_0)] / \ln 2 (t - t_0)$$

donde ( $t_0$ ) y ( $t$ ) representan el tiempo inicial y final del periodo estudiado expresados en días; ( $N_t$ ) y ( $N_0$ ) representan el número de células  $\cdot$  ml<sup>-1</sup> en dichos tiempos.

### **3.6. Viabilidad celular**

La viabilidad celular de los cultivos microalgales a diferentes concentraciones de ibuprofeno se estudia a través de la hidrólisis enzimática inespecífica del diacetato de fluoresceína (FDA) en las células de *C. reinhardtii*.

El FDA es un compuesto fluorogénico, cuya estructura se basa en un anillo de fluoresceína conjugado con dos moléculas radicales de acetato. La hidrólisis de esta molécula libera el anillo de fluoresceína, el cual emite la señal fluorescente (Adam & Duncan, 2001).

En las células, la molécula de FDA puede atravesar pasivamente la bicapa lipídica de la membrana plasmática. Una vez en el citoplasma celular, la actividad esterasa no específica hidroliza el FDA en fluoresceína y subproductos acéticos. Los grupos cargados presentes en la molécula de fluoresceína impiden su salida de la célula (Boyd et al., 2008). De esta forma, sólo las células viables son capaces de convertir el FDA en fluoresceína y producir la señal fluorescente (Clarke et al., 2001). La fluoresceína se excita en luz azul a 490 nm y emite en longitudes de onda dentro del espectro verde (525-530 nm).

En este trabajo, se preparan suspensiones celulares de  $4 \cdot 10^5$  células  $\cdot$  ml<sup>-1</sup> en tampón fosfato salino (PBS) estéril de cada tratamiento y se incuban en presencia de una concentración final de FDA de 0,4 g  $\cdot$  ml<sup>-1</sup> en oscuridad y durante 5 min. Pasado ese tiempo, la emisión de fluorescencia se observa bajo un microscopio de fluorescencia (NIKON Eclipse E600) equipado con una lámpara de mercurio, bajo un filtro de excitación 482-485 nm y recogiendo la emisión de las células a 536-540 nm. Se discrimina entre células fluorescentes metabólicamente activas capaces de hidrolizar el FDA (viables) y células no fluorescentes no metabólicamente activas (no viables). De este modo, los resultados se expresan como el porcentaje de células viables con respecto al total de células analizadas.

### **3.7. Determinación espectrofotométrica de clorofila *a***

A partir de volúmenes conocidos de los tratamientos ensayados, para la determinación de la clorofila *a* se utiliza acetona al 90% como solvente. Tras un proceso de ruptura celular sometiendo las suspensiones a sonicación, la cantidad de este pigmento se determina analizando la absorbancia del extracto con un espectrofotómetro (Shimadzu UV-1700) a varias longitudes de onda. A partir de las absorbancias obtenidas, el contenido de clorofila *a* se calcula mediante la siguiente ecuación (Jeffrey & Humphrey, 1975):

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

Los resultados obtenidos a partir de la ecuación se expresan en  $\mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$  de extracto;  $A_{664}$  y  $A_{647}$  representan las absorbancias medidas a 664 y 647 nm respectivamente.

### **3.8. Determinación del peso seco celular**

Para la determinación del peso seco celular ( $\text{pg} \cdot \text{célula}^{-1}$ ), se filtran volúmenes conocidos de cada uno de los tratamientos a través de un Multifilter, utilizando para ello filtros de microfibras de vidrio previamente secados y tarados en una balanza de precisión. La biomasa microalgal retenida en el filtro se deja secar en una estufa a  $60^{\circ}\text{C}$  hasta alcanzar un peso constante.

### **3.10. Determinación de la concentración inhibitoria media ( $\text{IC}_{50}$ )**

La concentración inhibitoria media ( $\text{IC}_{50}$ ) se define como la concentración de compuesto requerida para que se produzca una reducción del 50% en la respuesta para cada uno de los parámetros estudiados en *C. reinhardtii*.

A partir de los datos obtenidos en cada parámetro y para cada uno de los tratamientos, se calcula el porcentaje de inhibición con respecto a los cultivos control, utilizando para ello la siguiente fórmula:

$$\% \text{ inhibición} = [(\text{Control} - \text{Tratamiento}) / \text{Control}] \times 100$$

Utilizando el paquete de análisis estadístico y de gráficas avanzadas SigmaPlot versión 12.0, la  $\text{IC}_{50}$  se determina a partir de curvas no lineales aplicando un modelo sigmoideal de tres parámetros, con la excepción del cálculo de la  $\text{IC}_{50}$  para la viabilidad celular. En este caso, al tratarse de una variable no continua, dicho cálculo se lleva a cabo mediante un análisis Probit, utilizando el mismo programa arriba citado.

### **3.11. Análisis estadístico**

Para cada parámetro, se calculan y analizan estadísticamente las medias y las desviaciones estándar mediante un análisis de la varianza (ANOVA) de un factor bajo la hipótesis de que la concentración de ibuprofeno no afecta al parámetro de estudio. Cuando los resultados obtenidos son significativos, se utiliza el test de rango múltiple de Duncan para comparar las medias y analizar de qué forma afecta cada concentración de ibuprofeno al parámetro en cuestión. Se considera significativo un  $p$ -valor de  $< 0,05$ .

Para estudiar la posible interacción entre la concentración de ibuprofeno y el incremento en la intensidad luminosa recibida, las medias y las desviaciones estándar para cada parámetro son analizadas estadísticamente mediante un ANOVA multifactorial bajo la hipótesis de que no existe interacción entre la concentración de ibuprofeno y la irradiancia. Se considera significativo un  $p$ -valor de  $< 0,05$ .

Los análisis estadísticos se llevaron a cabo en el software SPSS Statistics (versión 21.0, SPSS, IBM).

#### **4. Resultados y discusión**

##### **4.1. Tasa de crecimiento**

La tasa de crecimiento de *C. reinhardtii* se vio afectada significativamente ( $p < 0,05$ ) a concentraciones iguales o superiores a  $500 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$ , observándose una disminución en el crecimiento celular de los cultivos de esta microalga (Tabla I). Esta inhibición provocada por la exposición a este fármaco también se ha observado en otras especies de microalgas dulceacuícolas como *Scenedesmus rubescens*, donde también se produjo una reducción en el crecimiento a las concentraciones más altas ensayadas ( $250$  y  $1000 \text{ } \mu\text{g} \cdot \text{l}^{-1}$ ) tras 30 días de exposición (Moro et al., 2014). En *Pseudokirchneriella subcapitata*, la disminución en el crecimiento también tuvo lugar a  $500 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$  tras 72 h de exposición (Aguirre-Martínez et al., 2015) y en la microalga marina *Isochrysis galbana*, el ibuprofeno inhibió su crecimiento a  $5 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$  y de manera concentración-dependiente a concentraciones superiores a ésta (Aguirre-Martínez et al., 2015). El efecto inhibitorio del ibuprofeno también se ha encontrado en otros microorganismos como bacterias (Elvers and Wright, 1995) y hongos (Sanyal et al., 1993) a concentraciones de  $150 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$  y  $5\text{-}40 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$  respectivamente. Incluso en plantas acuáticas como *Lemna minor* el ibuprofeno afectó negativamente a su crecimiento a  $1, 10, 100$  y  $1000 \text{ } \mu\text{g} \cdot \text{l}^{-1}$  tras 7 días de exposición (Pomati et al., 2014).

**Tabla I.** Efecto del ibuprofeno en el crecimiento de las células de *C. reinhardtii* tras 72 h de exposición a baja y a alta irradiancia.

<b>Ibuprofeno (<math>\text{mg} \cdot \text{l}^{-1}</math>)</b>	<b>Baja irradiancia</b>	<b>Alta irradiancia</b>
	<b>Tasa de crecimiento (<math>\mu</math>) (<math>\text{día}^{-1}</math>)</b>	<b>Tasa de crecimiento (<math>\mu</math>) (<math>\text{día}^{-1}</math>)</b>
<b>Control</b>	$1,75 \pm 0,07^a$	$1,71 \pm 0,06^a$
<b>10</b>	$1,71 \pm 0,03^a$	$1,24 \pm 0,05^b$
<b>100</b>	$1,63 \pm 0,17^a$	$0,94 \pm 0,00^c$
<b>500</b>	$0,27 \pm 0,00^b$	$0,00 \pm 0,05^d$
<b>1000</b>	$0,06 \pm 0,03^b$	$-0,09 \pm 0,12^d$

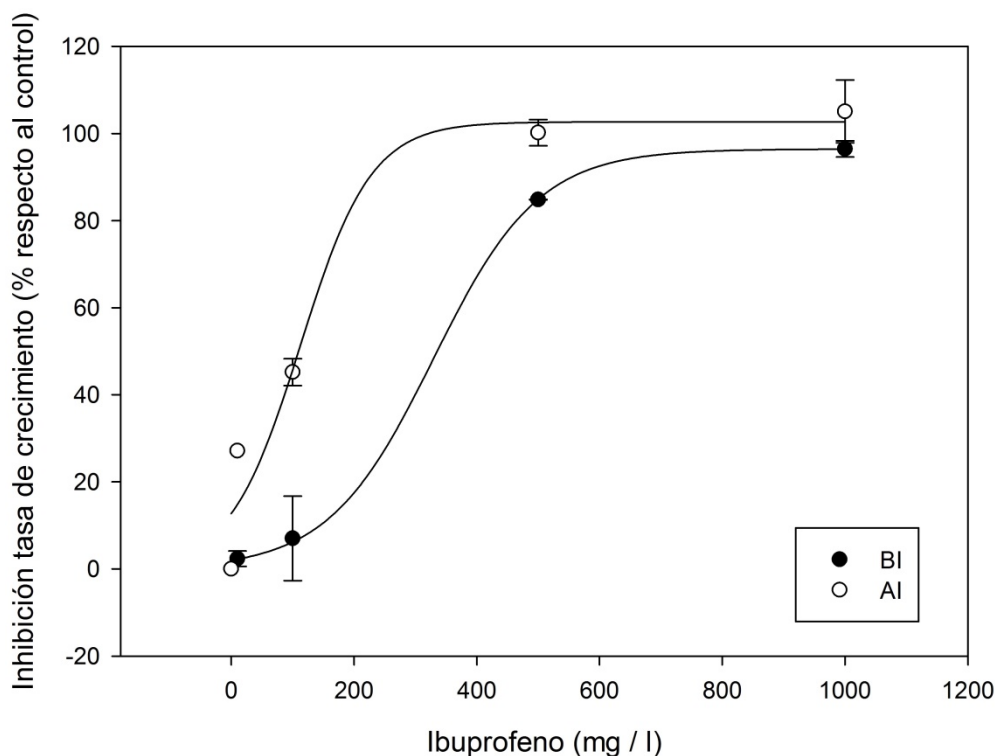
Los valores mostrados corresponden a la media  $\pm$  SD de cada duplicado experimental. Las distintas letras indican diferencias significativas entre tratamientos ( $p < 0,05$ ).



En la figura 3 se muestra la curva de concentración-respuesta obtenida para el cálculo de la  $IC_{50}$  de la tasa de crecimiento de los cultivos expuestos a  $70 \mu\text{mol} \cdot \text{fotón m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$  y a diferentes concentraciones de ibuprofeno después 72 h. La concentración inhibitoria media ( $IC_{50}$ ) obtenida para la tasa de crecimiento en los cultivos de *C. reinhardtii* tras 72 h de exposición al ibuprofeno fue de  $328,99 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$ . Estudios previos registraron valores de  $IC_{50}$  de  $315 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$  (Cleuvers, 2003) y de  $342,2 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$  (Cleuvers, 2004) de ibuprofeno para la microalga *Desmodesmus subspicatus*, los cuales son similares a los aportados en este trabajo.

En el medio ambiente acuático, se han detectado concentraciones de ibuprofeno de  $0,087 \mu\text{g} \cdot \text{l}^{-1}$  (Winkler et al., 2001) y de  $12 \mu\text{g} \cdot \text{l}^{-1}$  (Stumpf et al., 1998); al noroeste de Galicia, se han registrado concentraciones de  $7,5 \mu\text{g} \cdot \text{l}^{-1}$  (Rodil et al., 2012). Es decir, las concentraciones a las cuales se ha detectado el ibuprofeno en los ecosistemas acuáticos son inferiores a aquellas que experimentalmente producen efectos adversos sobre potenciales organismos no diana como las microalgas. Por tanto, y a pesar de que este fármaco presenta un efecto tóxico sobre *C. reinhardtii*, el crecimiento no parece ser un parámetro muy sensible a la hora de evaluar el verdadero peligro ecológico del ibuprofeno. A modo de respaldo, la Directiva 93/67/CEE de la Unión Europea (*Commission of the European Communities*, 1996) clasifica compuestos en diferentes categorías de riesgo acorde al valor de  $IC_{50}$  más bajo medido. Una  $IC_{50}$  de  $< 1 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$  clasifica la sustancia en cuestión como “muy tóxica para los organismos acuáticos”; de 1 a  $10 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$  se considera “tóxica para los organismos acuáticos”, y de 11 a  $100 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$  “dañina para los organismos acuáticos”. Sustancias con  $IC_{50} > 100 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$ , en donde se incluiría el ibuprofeno, no entrarían dentro de esta clasificación.

En el caso de los cultivos expuestos a  $200 \mu\text{mol} \cdot \text{fotón m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ , el ibuprofeno ejerció un efecto inhibitorio significativo ( $p < 0,05$ ) y dependiente de concentración significativo sobre la tasa de crecimiento de los cultivos de *C. reinhardtii* a partir de los  $10 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$  (Tabla I). En la figura 3 se muestra la curva de concentración-respuesta obtenida para el cálculo de la  $IC_{50}$  de la tasa de crecimiento de los cultivos expuestos a  $200 \mu\text{mol} \cdot \text{fotón m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$  y a diferentes concentraciones de ibuprofeno después de 72 h. En cuanto a la  $IC_{50}$ , ésta presentó un valor de  $112,53 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$ , menor que el obtenido a  $70 \mu\text{mol} \cdot \text{fotón m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ , lo que indicaría que el efecto del ibuprofeno se agudiza cuando se incrementa la intensidad lumínica. Este dato sugiere la existencia de un efecto sinérgico significativo (ANOVA multifactorial,  $p < 0,05$ ) entre ésta y la concentración de ibuprofeno en el medio de cultivo.



**Fig. 3.** Curvas de concentración-respuesta donde se representa el porcentaje de inhibición sobre la tasa de crecimiento de los cultivos de *C. reinhardtii* con respecto al control a baja y alta irradiancia tras 72 h de exposición a diferentes concentraciones de ibuprofeno. Los datos expresan la media de las réplicas  $\pm$  desviación estándar.

Se ha comprobado que los compuestos antiinflamatorios no esteroideos, entre ellos el ibuprofeno, se degradan en compuestos intermediarios en presencia de luz (Condorelli et al., 1993) que también pueden llegar a ser nocivos. Un ejemplo se recoge en un estudio en el cual se ha visto que los fotoproductos originados a partir del ibuprofeno adquieren efectos tóxicos sobre glóbulos rojos y fibroblastos humanos (Castell et al., 1987). Esta fototoxicidad no es exclusiva únicamente de los compuestos antiinflamatorios no esteroideos: el antibiótico oxitetraciclina, libera fotoproductos que afectan a la integridad intracelular de bacterias tras su exposición a la luz (Martin et al., 1987). No obstante, según la Directiva 93/67/CEE de la Unión Europea (*Commission of the European Communities*, 1996) anteriormente mencionada, la  $IC_{50}$  obtenida señalaría que tampoco sería suficiente para incluirlo dentro de esta clasificación de riesgo ecológico.

#### 4.2. Viabilidad celular

El porcentaje viabilidad celular en los cultivos de *C. reinhardtii* se vio afectado por el ibuprofeno de forma significativa ( $p < 0,05$ ), observándose un 100% de células no viables a concentraciones de  $500 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$  o superiores tras 72 h de exposición, mientras que a concentraciones inferiores el porcentaje de viabilidad de los cultivos de *C.*

*reinhardtii* fue superior al 94% (Tabla II). La IC<sub>50</sub> calculada mediante un análisis Probit para este parámetro proporcionó un valor de 211,57 mg · l<sup>-1</sup>. En *Chlamydomonas moewusii*, se constató un descenso en el porcentaje de células viables tanto a 3 como a 24 h de exposición a la concentración de ibuprofeno más alta ensayada (180 mg · l<sup>-1</sup>) (Prado et al., 2015). Sin embargo, en ese mismo estudio, la microalga *Chlorella vulgaris* no mostró ningún tipo de efecto al ibuprofeno para ninguna de las concentraciones utilizadas. En lo referente a otros organismos acuáticos, también se han registrado efectos nocivos del ibuprofeno sobre la viabilidad celular: en el molusco *Planorbis carinatus*, se produjo una letalidad del 100% de adultos a una concentración de ibuprofeno de 100 mg · l<sup>-1</sup> tras 72 h de exposición (Pounds et al., 2008). Por otro lado, en el caso del bivalvo *Dreissena polymorpha* se observó un incremento tiempo y concentración-dependiente en el número de células apoptóticas a concentraciones de 1, 9 y 35 nM (Parolini et al., 2011).

**Tabla II.** Efecto del ibuprofeno en la viabilidad de las células de *C. reinhardtii* tras 72 h de exposición a baja y a alta irradiancia.

Ibuprofeno (mg · l <sup>-1</sup> )	Baja irradiancia	Alta irradiancia
	Viabilidad (%)	Viabilidad (%)
Control	94,05 ± 8,42 <sup>a</sup>	87,63 ± 0,18 <sup>a</sup>
10	89,67 ± 8,02 <sup>a</sup>	88,54 ± 9,77 <sup>a</sup>
100	96,81 ± 4,51 <sup>a</sup>	89,38 ± 11,29 <sup>a</sup>
500	0,00 ± 0,00 <sup>b</sup>	0,00 ± 0,00 <sup>b</sup>
1000	0,00 ± 0,00 <sup>b</sup>	0,00 ± 0,00 <sup>b</sup>

Los valores mostrados corresponden a la media ± SD de cada duplicado experimental. Las distintas letras indican diferencias significativas entre tratamientos ( $p < 0,05$ ).

Tras el incremento en la irradiación lumínica recibida por los cultivos, el porcentaje de células no viables también fue del 100% para concentraciones iguales o superiores a 500 mg · l<sup>-1</sup> (Tabla II). A pesar de ello, una IC<sub>50</sub> de 174,05 mg · l<sup>-1</sup> señaló que bajo estas condiciones de intensidad lumínica, los efectos tóxicos del ibuprofeno aumentan.

#### 4.3. Contenido celular en clorofila *a*

El contenido celular en clorofila *a* se redujo significativamente ( $p < 0,05$ ) en aquellos cultivos de *C. reinhardtii* expuestos durante 72 h a concentraciones de ibuprofeno iguales o superiores a de 100 mg · l<sup>-1</sup> o superiores con respecto al control (Tabla III). Estos

efectos nocivos también se han constatado en otras especies de microalgas: en *Chlamydomonas moewusii*, concentraciones de ibuprofeno de 140 mg · l<sup>-1</sup> y 180 mg · l<sup>-1</sup> provocaron la aparición de células cloróticas (con niveles residuales de clorofila *a*) tras una exposición de 3 h (Prado et al., 2015). En *Scenedesmus rubescens*, también se registró una disminución en el contenido de clorofilas (*a* y *b*) en aquellos cultivos que fueron tratados con ibuprofeno durante 7 días (Moro et al., 2014). Sin embargo, en cultivos de *Pseudokirchneriella subcapita* tratados con una mezcla de fármacos entre los que se encontraba el ibuprofeno, no hubo una disminución significativa en el contenido de clorofila *a* tras una exposición de 72 h (Vannini et al., 2011). Algunos autores señalaron que el ibuprofeno puede modificar el estatus oxidativo de las células de plantas terrestres, estimulando así la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS) (González-Naranjo et al., 2015). Por tanto, la explicación para esta reducción en el contenido celular de clorofila *a* podría residir en la aparición de un estado de estrés celular inducido por la presencia del ibuprofeno que incrementa la generación de ROS, lo cual daña los componentes del PSII (Krause and Weis, 1991) y, con ello, las clorofilas que lo componen.

**Tabla III.** Efecto del ibuprofeno en el contenido en clorofila *a* de las células de *C. reinhardtii* tras 72 h de exposición a baja y a alta irradiancia.

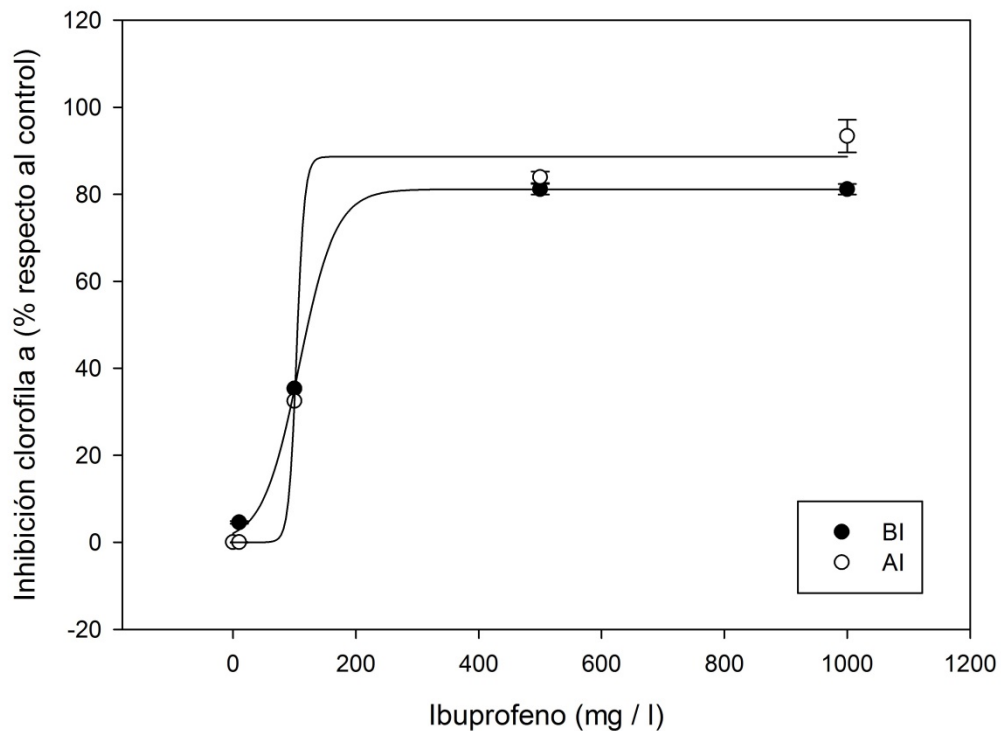
<b>Ibuprofeno (mg · l<sup>-1</sup>)</b>	<b>Baja irradiancia</b>	<b>Alta irradiancia</b>
	<b>Clorofila a (pg · cel<sup>-1</sup>)</b>	<b>Clorofila a (pg · cel<sup>-1</sup>)</b>
<b>Control</b>	1,00 ± 0,05 <sup>a</sup>	1,80 ± 0,01 <sup>a</sup>
<b>10</b>	0,95 ± 0,21 <sup>a</sup>	2,00 ± 0,00 <sup>b</sup>
<b>100</b>	0,64 ± 0,00 <sup>b</sup>	1,21 ± 0,00 <sup>c</sup>
<b>500</b>	0,19 ± 0,01 <sup>c</sup>	0,29 ± 0,02 <sup>d</sup>
<b>1000</b>	0,19 ± 0,01 <sup>c</sup>	0,12 ± 0,07 <sup>e</sup>

Los valores mostrados corresponden a la media ± SD de cada duplicado experimental. Las distintas letras indican diferencias significativas entre tratamientos ( $p < 0,05$ ).

En los cultivos de *C. reinhardtii* expuestos a 200 μmol · fotón m<sup>-2</sup> · s<sup>-1</sup>, se produjo un incremento significativo ( $p < 0,05$ ) en la clorofila *a* a 10 mg · l<sup>-1</sup> de ibuprofeno con respecto al control. Sin embargo, a partir de los 100 mg · l<sup>-1</sup> este fármaco inhibió significativamente ( $p < 0,05$ ) y de forma concentración-dependiente la cantidad de este pigmento (Tabla III). Los fotosistemas celulares incrementan su actividad fotosintética en presencia de elevadas intensidades de luz para así deshacerse de la energía excesiva y esto provoca un aumento en las cantidades intracelulares de ROS (Vass et al., 1992). Por tanto, en respuesta a estas condiciones de estrés, las células de *C. reinhardtii* podrían estar incrementando su

actividad metabólica para hacer frente al contaminante al cual están expuestas, lo que podría estar relacionado con el aumento en el contenido de clorofila *a* que se produce a la concentración más baja de ibuprofeno ensayada. Sin embargo, la caída concentración-dependiente que tiene lugar a partir de los 100 mg · l<sup>-1</sup>, podría deberse a que, junto con los efectos potencialmente inducidos por el ibuprofeno, se produce una acumulación excesiva de ROS por la cual los sistemas de defensa antioxidante de las células microalgales ya no serían efectivos para contrarrestar dicho estrés.

En la figura 4 se muestra la curva de concentración-respuesta obtenida para el cálculo de la IC<sub>50</sub> del contenido celular de *C. reinhardtii* de los cultivos expuestos tanto a 70 como 200 μmol · fotón m<sup>-2</sup> · s<sup>-1</sup> y a diferentes concentraciones de ibuprofeno durante 72 h. La IC<sub>50</sub> para el contenido en clorofila *a* de *C. reinhardtii* proporcionó un valor de 107,71 mg · l<sup>-1</sup> de ibuprofeno, siendo el parámetro que mostró el valor más bajo y, por tanto, el más sensible de los cuatro analizados en este estudio; con un aumento en la intensidad lumínica, la IC<sub>50</sub> disminuyó hasta un valor de 103,59 mg · l<sup>-1</sup>. La acción combinada entre la concentración de ibuprofeno y el aumento de la irradiación lumínica fue significativa (ANOVA multifactorial, *p*-valor < 0,05). Esta reducción más acusada en el contenido de clorofila *a* en los cultivos de *C. reinhardtii* a un incremento en la intensidad lumínica podría deberse a un efecto sinérgico entre el fármaco y el incremento en la irradiancia de luz, lo cual respalda la explicación ofrecida anteriormente.



**Fig. 4.** Curvas de concentración-respuesta donde se representa el porcentaje de inhibición sobre la el contenido en clorofila *a* de los cultivos de *C. reinhardtii* con respecto al control a baja y alta irradiancia tras 72 h de exposición a diferentes concentraciones de ibuprofeno. Los datos expresan la media de las réplicas  $\pm$  desviación estándar.

#### 4.4. Peso seco celular

En el peso seco celular de *C. reinhardtii*, se observó una disminución significativa ( $p < 0.05$ ) en aquellos cultivos expuestos a concentraciones de  $500 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$  o superiores de ibuprofeno (Tabla IV), y la  $\text{IC}_{50}$  presentó un valor de  $324,36 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$ . El peso seco celular es una medida muy relacionada con la tasa de crecimiento celular, por lo que si se comparan los resultados obtenidos, se puede deducir cierta relación entre ambos parámetros, ya que muestran tendencias muy similares: el efecto tóxico del ibuprofeno en los cultivos de *C. reinhardtii* se observó a los  $500 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$  en ambos parámetros, mientras que con una irradiancia lumínica de  $200 \mu\text{mol} \cdot \text{fotón} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ , la inhibición en ambos parámetros se observó a los  $10 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$  (Tabla IV).

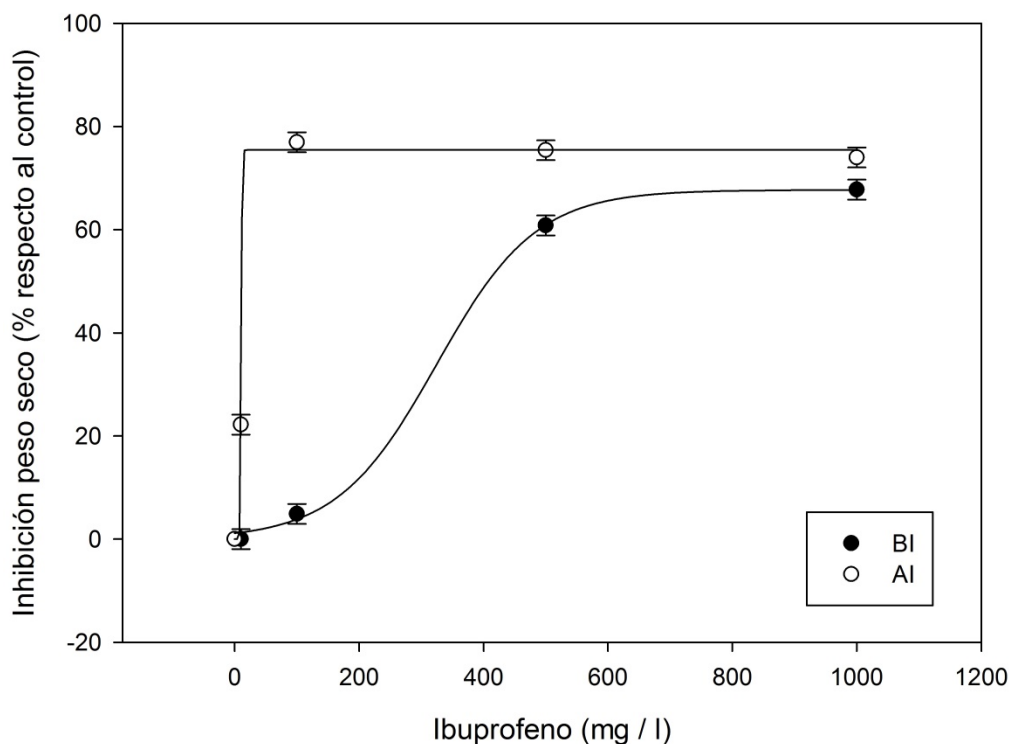
**Tabla IV.** Efecto del ibuprofeno en el peso seco de las células de *C. reinhardtii* tras 72 h de exposición a baja y a alta irradiancia.

<b>Ibuprofeno (mg · l<sup>-1</sup>)</b>	<b>Baja irradiancia</b>	<b>Alta irradiancia</b>
	<b>Peso seco (pg · cel<sup>-1</sup>)</b>	<b>Peso seco (pg · cel<sup>-1</sup>)</b>
<b>Control</b>	73,26 ± 1,41 <sup>a</sup>	73,26 ± 1,41 <sup>a</sup>
<b>10</b>	75,68 ± 1,41 <sup>a</sup>	57,02 ± 1,41 <sup>b</sup>
<b>100</b>	69,70 ± 1,41 <sup>a</sup>	16,89 ± 1,41 <sup>c</sup>
<b>500</b>	28,70 ± 1,41 <sup>b</sup>	18,01 ± 1,41 <sup>c</sup>
<b>1000</b>	23,60 ± 1,41 <sup>c</sup>	19,05 ± 1,41 <sup>c</sup>

Los valores mostrados corresponden a la media ± SD de cada duplicado experimental. Las distintas letras indican diferencias significativas entre tratamientos ( $p < 0,05$ ).

En la planta acuática *Lemna gibba*, la exposición a 1 mg · l<sup>-1</sup> de ibuprofeno durante 7 días no tuvo ningún tipo de efecto sobre la biomasa húmeda (Brain et al., 2004). No obstante, en otro estudio en donde emplearon esa especie, la misma concentración de ibuprofeno provocó un incremento en el peso seco tras 8 días de exposición (Pietrini et al., 2015). En animales también se encontraron efectos nocivos ejercidos por otros fármacos ejercidos sobre el peso seco celular: el ácido mefenámico, otro antiinflamatorio no esteroideo, provocó una disminución en el peso seco de larvas y juveniles de *Danio rerio* al ser expuestos a concentraciones de 0,1 y 1 mg · l<sup>-1</sup> (Collard et al., 2013).

En la figura 5 se muestra la curva de concentración-respuesta obtenida para el cálculo de la IC<sub>50</sub> del peso seco de los cultivos expuestos a 70 μmol · fotón m<sup>-2</sup> · s<sup>-1</sup> y a diferentes concentraciones de ibuprofeno durante 72 h. Las IC<sub>50</sub> también reflejan las similitudes descritas anteriormente entre el peso seco celular y la tasa de crecimiento, ya que presentan valores muy similares: para el peso seco celular en los cultivos de *C. reinhardtii* expuestos a 70 μmol · fotón m<sup>-2</sup> · s<sup>-1</sup>, la IC<sub>50</sub> presenta un valor de 324,36 mg · l<sup>-1</sup>, mientras que para IC<sub>50</sub> calculada la tasa de crecimiento, se obtuvo un valor de 328,99 mg · l<sup>-1</sup>.



**Fig. 5.** Curvas de concentración-respuesta donde se representa el porcentaje de inhibición sobre la el peso seco celular de los cultivos de *C. reinhardtii* con respecto al control a baja y alta irradiancia tras 72 h de exposición a diferentes concentraciones de ibuprofeno.

Con un incremento en la intensidad lumínica, se produjo un descenso significativo ( $p < 0,05$ ) en el peso seco de las células de *C. reinhardtii* a  $10 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$  de ibuprofeno, siendo más acusado a  $100 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$  (Tabla III). En la figura 5 se muestra la curva de concentración-respuesta obtenida para el cálculo de la  $\text{IC}_{50}$  del peso seco de los cultivos expuestos a  $200 \mu\text{mol} \cdot \text{fotón m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$  y a diferentes concentraciones de ibuprofeno durante 72 h. El valor de la  $\text{IC}_{50}$  se redujo drásticamente a  $10,61 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$ . Por tanto, el aumento en la intensidad lumínica produjo un incremento en el efecto tóxico del ibuprofeno, lo que indica la existencia de un efecto sinérgico significativo (ANOVA multifactorial,  $p$ -valor  $< 0,05$ ) entre ambos factores también para este parámetro.



## **5. Conclusiones/Conclusions**

1. El ibuprofeno provoca una inhibición en todos los parámetros analizados en los cultivos de la microalga *Chlamydomonas reinhardtii*. En los cultivos expuestos a una intensidad lumínica de  $70 \mu\text{mol} \cdot \text{fotón m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ , la tasa de crecimiento y el peso seco celular disminuyen en los cultivos expuestos a concentraciones iguales o superiores a  $500 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$ ; el porcentaje de viabilidad celular presenta un valor de 0% a concentraciones iguales o superiores a  $500 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$  y el contenido celular en clorofila *a* se reduce a partir de  $100 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$  de fármaco.
2. En los cultivos de *C. reinhardtii* expuestos al ibuprofeno y a una intensidad lumínica de  $70 \mu\text{mol} \cdot \text{fotón m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ , el contenido celular en clorofila *a* presenta un valor de  $\text{IC}_{50}$  de  $107,71 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$ , siendo el más bajo entre todos los parámetros estudiados.
3. En los cultivos de *C. reinhardtii* expuestos a diferentes concentraciones de ibuprofeno y sometidos a una intensidad lumínica de  $200 \mu\text{mol} \cdot \text{fotón m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$  también tiene lugar una inhibición para todos los parámetros estudiados. Además, las  $\text{IC}_{50}$  obtenidas son menores que las  $\text{IC}_{50}$  correspondientes a una intensidad lumínica de  $70 \mu\text{mol} \cdot \text{fotón m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$  para todos los parámetros estudiados, lo que sugiere la existencia de una interacción de tipo sinérgico entre el ibuprofeno y la irradiación lumínica en *C. reinhardtii*.

1. All the analyzed parameters in cultures of *Chlamydomonas reinhardtii* are inhibited by ibuprofen for both light conditions after an exposition of 72 h. In cultures exposed to a light intensity of  $70 \mu\text{mol} \cdot \text{photon m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ , growth rate and cell dry weight decrease in those cultures exposed to  $500 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$  or higher; cell viability percentage is 0 from  $500 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$  and cell content of chlorophyll *a* decreases from  $100 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$ .
2. In cultures of *C. reinhardtii* exposed to ibuprofen and to a light intensity of  $70 \mu\text{mol} \cdot \text{photon m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ , cell content of chlorophyll *a* shows a  $\text{IC}_{50}$  value of  $107,71 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$ , which is the lowest  $\text{IC}_{50}$  value within all the studied parameters.
3. In cultures of *C. reinhardtii* exposed to different concentrations of ibuprofen and to a light irradiance of  $200 \mu\text{mol} \cdot \text{photon m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ , all the analyzed parameters are

inhibited as well. Moreover, the  $IC_{50}$  values obtained are lower than the  $IC_{50}$  values corresponding to  $70 \mu\text{mol} \cdot \text{photon m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$  for all the studied parameters, suggesting the existence of a synergetic interaction between ibuprofen and light irradiance.

## **6. 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): 943-951.
- 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.
- Boyd, V., Cholewa, O. M., Papas, K. K. (2008). Limitations in the use of fluorescein diacetate/propidium iodide (FDA/PI) and cell permeable nucleic acid stains for viability measurements of isolated islets of Langerhans. *Current trends in biotechnology and pharmacy*, 2 (2): 66.
- Brain, R. A., Johnson, D. J., Richards, S. M., Sanderson, H., Sibley, P. K., Solomon, K. R. (2004). Effects of 25 pharmaceutical compounds to *Lemna gibba* using a seven-day static-renewal test. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 23 (2): 371-382.
- Brown, T. E., Richardson, F. L., Vaughn, M. L. (1967). Development of Red Pigmentation in *Chlorococcum wimmeri* (Chlorophyta: Chlorococcales). *Phycologia*, 6 (4): 167-184.
- Castell, J. V., Miranda, M. A., Morera, I. M. (1987). Photolytic degradation of ibuprofen. Toxicity of the isolated photoproducts on fibroblasts and erythrocytes. *Photochemistry and photobiology*, 46 (6): 991-996.
- Clarke, J.M., Gillings, M.R., Altavilla, N., Beattie, A.J. (2001). Potential problems with fluorescein diacetate assays of cell viability when testing natural products for antimicrobial activity. *Journal of microbiological methods*, 46 (3): 261-267.
- Cleuvers, M. (2003). Aquatic ecotoxicity of pharmaceuticals including the assessment of combination effects. *Toxicology letters*, 142 (3): 185-194.
- Cleuvers, M. (2004). Mixture toxicity of the anti-inflammatory drugs diclofenac, ibuprofen, naproxen, and acetylsalicylic acid. *Ecotoxicology and environmental safety*, 59 (3): 309-315.
- Collard, H. R. J., Ji, K., Lee, S., Liu, X., Kang, S., Kho, Y., Ahn, B., Ryu, J., Lee, J., Choi, K. (2013). Toxicity and endocrine disruption in zebrafish (*Danio rerio*) and two freshwater

invertebrates (*Daphnia magna* and *Moina macrocopa*) after chronic exposure to mefenamic acid. *Ecotoxicology and environmental safety*, 94: 80-86.

Commission of the European Communities, 1996. Technical Guidance Document in Support of Commission 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. Office for Official Publications of the European Communities, Luxembourg.

Condorelli, G., De Guidi, G., Giuffrida, S., Costanzo, L. L. (1993). Photosensitizing action of nonsteroidal antiinflammatory drugs on cell membranes and design of protective systems. *Coordination chemistry reviews*, 125 (1-2): 115-127.

Crain, C. M., Kroeker, K., Halpern, B. S. (2008). Interactive and cumulative effects of multiple human stressors in marine systems. *Ecology letters*, 11 (12): 1304-1315.

Dieckmann, C.L. (2003). Eyespot placement and assembly in the green alga *Chlamydomonas*. *Bioessays*, 25 (4): 410-416.

Elvers, K. T., Wright, S. J. L. (1995). Antibacterial activity of the anti-inflammatory compound ibuprofen. *Letters in applied microbiology*, 20 (2): 82-84.

Esperanza, M., Seoane, M., Rioboo, C., Herrero, C., Cid, Á. (2016). Early alterations on photosynthesis-related parameters in *Chlamydomonas reinhardtii* cells exposed to atrazine: A multiple approach study. *Science of the Total Environment*, 554: 237-245.

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 (3-4): 207-215.

González-Naranjo, V., Boltes, K., de Bustamante, I., Palacios-Díaz, P. (2015). Environmental risk of combined emerging pollutants in terrestrial environments: chlorophyll a fluorescence analysis. *Environmental Science and Pollution Research*, 22 (9): 6920-6931.

Heberer, T. (2002). Tracking persistent pharmaceutical residues from municipal sewage to drinking water. *Journal of Hydrology*, 266 (3): 175-189.

Holmstrup, M., Bindesbøl, A. M., Oostingh, G. J., Duschl, A., Scheil, V., Köhler, H. R., Loureiro, S., Soares, A., Ferreira, A. I. G., Kienle, C., Gerhardt, A., Laskowski, R., Kramarz, P. E.,

- Bayley, M., Svendsen, C., Spurgeon, D. J. (2010). Interactions between effects of environmental chemicals and natural stressors: a review. *Science of the Total Environment*, 408 (18): 3746-3762.
- Jeffrey, S. T., 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 : BPP*, 167: 191-194.
- Krause, G. H., Weis, E. (1991). Chlorophyll fluorescence and photosynthesis: the basics. *Annual review of plant biology*, 42 (1): 313-349.
- Martin, J. P., Colina, K., Logsdon, N. (1987). Role of oxygen radicals in the phototoxicity of tetracyclines toward *Escherichia coli* B. *Journal of bacteriology*, 169 (6): 2516-2522.
- Matamoros, V., Uggetti, E., García, J., Bayona, J. M. (2016). Assessment of the mechanisms involved in the removal of emerging contaminants by microalgae from wastewater: a laboratory scale study. *Journal of hazardous materials*, 301: 197-205.
- Merchant, S.S., Prochnik, S.E., Vallon, O., Harris, E.H., Karpowicz, S. J., Witman, G. B., Terry A., Salamov, A., Fritz-Laylin, L. K., Maréchal-Drouard, L., Marshall, W. F., Qu, L., Nelson, D. R., Sanderfoot, A. A., Spalding, M. H., Kapitonov, V. V., Ren, Q., Ferris, P., Lindquist, E., Shapiro, H., Lucas, S. M., Grimwood, J., Schmutz, J., *Chlamydomonas* Annotation Team, JGI Annotation Team, Grigoriev, I. V., Rokhsar, D. S., Grossman, A. R. (2007). The *Chlamydomonas* Genome Reveals the Evolution of Key Animal and Plant Functions. *Science*. 318 (5848): 245-251.
- Miranda-García, N., Suárez, S., Sánchez, B., Coronado, J.M., Malato, S., Maldonado, M.I. (2011). Photocatalytic degradation of emerging contaminants in municipal wastewater treatment plant effluents using immobilized TiO<sub>2</sub> in a solar pilot plant. *Applied Catalysis B: Environmental*, 103 (3): 294-301.
- Moro, I., Matozzo, V., Piovan, A., Moschin, E., Dalla Vecchia, F. (2014). Morpho-physiological effects of ibuprofen on *Scenedesmus rubescens*. *Environmental toxicology and pharmacology*, 38 (2): 379-387.
- Murray, K.E., Thomas, S.M., Bodour, A.A. (2010). Prioritizing research for trace pollutants and emerging contaminants in the freshwater environment. *Environmental Pollution*, 158 (12): 3462-3471.

- Nickelsen, J., Kück, U. (2000). The unicellular green alga *Chlamydomonas reinhardtii* as an experimental system to study chloroplast RNA metabolism. *Naturwissenschaften*, 87 (3): 97-107.
- Pal, A., He, Y., Jekel, M., Reinhard, M., Gin, K. Y. H. (2014). Emerging contaminants of public health significance as water quality indicator compounds in the urban water cycle. *Environment international*, 71: 46-62.
- Parolini, M., Binelli, A., Provini, A. (2011). Chronic effects induced by ibuprofen on the freshwater bivalve *Dreissena polymorpha*. *Ecotoxicology and environmental safety*, 74 (6): 1586-1594.
- Pietrini, F., Di Baccio, D., Aceña, J., Pérez, S., Barceló, D., Zacchini, M. (2015). Ibuprofen exposure in *Lemna gibba* L.: Evaluation of growth and phytotoxic indicators, detection of ibuprofen and identification of its metabolites in plant and in the medium. *Journal of hazardous materials*, 300: 189-193.
- 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 (4): 387-396.
- Pounds, N., Maclean, S., Webley, M., Pascoe, D., Hutchinson, T. (2008). Acute and chronic effects of ibuprofen in the mollusc *Planorbis carinatus* (Gastropoda: Planorbidae). *Ecotoxicology and environmental safety*, 70 (1): 47-52.
- Prado, R., García, R., Rioboo, C., Herrero, C., Cid, Á. (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 (10): 1040-1049.
- Sager, R., Granick, S. (1954). Nutritional control of sexuality in *Chlamydomonas reinhardi*. *The Journal of General Physiology*, 37 (6): 729-742.
- Sanyal, A. K., Roy, D., Chowdhury, B., Banerjee, A. B. (1993). Ibuprofen, a unique anti-inflammatory compound with antifungal activity against dermatophytes. *Letters in applied microbiology*, 17 (3): 109-111.

- Stumpf, M., Ternes, T., Haberer, K., Baumann, W. (1998). Isolation of ibuprofen-metabolites and their importance as pollutants of the aquatic environment. *Vom Wasser*, 91: 291-304.
- Vass, I., Styring, S., Hundal, T., Koivuniemi, A., Aro, E., Andersson, B. (1992). Reversible and irreversible intermediates during photoinhibition of photosystem II: stable reduced QA species promote chlorophyll triplet formation. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 89 (4): 1408-1412.
- 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 (2): 459-465.
- Villarreal, J.C., Renner, S.S. (2012). Hornwort pyrenoids, carbon-concentrating structures, evolved and were lost at least five times during the last 100 million years. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 109 (46): 18873-18878.
- Winkler, M., Lawrence, J.R., Neu, T.R. (2001). Selective degradation of ibuprofen and clofibric acid in two model river biofilm systems. *Water Research*, 35 (13): 3197-3205.

## **Abreviaturas**

<b>AI</b>	Alta irradiancia
<b>BI</b>	Baja irradiancia
<b>CCAP</b>	Colección de Cultivos de Algas y Protozoos
<b>FDA</b>	Diacetato de fluoresceína
<b>IC<sub>50</sub></b>	Concentración inhibitoria media
<b>PBS</b>	Tampón fosfato salino
<b>ROS</b>	Especies reactivas de oxígeno