



UNIVERSIDADE DA CORUÑA
Facultade de Ciencias

Grao en Bioloxía

Memoria do Traballo de Fin de Grao

Citotoxicidad de una loción micelar cosmética y fragmentos de mascarillas quirúrgicas en la microalga Raphidocelis subcapitata

Citotoxicidade dunha loción micelar cosmética e fragmentos de máscaras quirúrxicas na microalga Raphidocelis subcapitata

Cytotoxicity of a cosmetic micellar lotion and fragmented surgical face masks in the microalga Raphidocelis subcapitata



Daniel Montero Cotelo

Curso: 2021 - 2022.

Convocatoria: Julio

Directora: Carmen Rioboo Blanco

ÍNDICE DE ABREVIATURAS	2
RESUMEN / RESUMO / ABSTRACT	3
INTRODUCCIÓN	6
OBJETIVOS.....	8
MATERIAL Y MÉTODOS.....	8
Descripción de <i>Raphidocelis subcapitata</i>	8
Cultivo de <i>Raphidocelis subcapitata</i>	8
Determinación de la densidad celular y cálculo de la tasa de crecimiento.....	9
Determinación de la viabilidad celular.....	10
Análisis de la actividad fotosintética del cultivo.....	11
Diseño experimental.....	11
Análisis estadístico.....	12
RESULTADOS Y DISCUSIÓN	13
Cálculo de la EC50.....	13
Efecto de los tratamientos sobre la tasa de crecimiento de <i>Raphidocelis subcapitata</i>	14
Efecto de los tratamientos sobre la viabilidad celular de <i>Raphidocelis subcapitata</i>	16
Efecto de los tratamientos sobre la actividad fotosintética de <i>Raphidocelis subcapitata</i> ..	17
CONCLUSIONES / CONCLUSIÓN S / CONCLUSIONS	18
BIBLIOGRAFÍA	20

ÍNDICE DE ABREVIATURAS

- ANOVA: Análisis de las varianzas.
- EC50: Concentración Efectiva media.
- PI: Yoduro de Propidio.
- C: Control.
- M: Mascarilla.
- PCP: Productos de Cuidado Personal.
- GM-SWF: GoldMedium Fresh-Water Species.
- PSII: Fotosistema II.
- FL: Detector de fluorescencia.
- FS: Señal de dispersión frontal.
- SS: Señal de dispersión lateral.

RESUMEN / RESUMO / ABSTRACT

Los contaminantes emergentes, como el agua micelar (solución micelar), son compuestos tóxicos para los ecosistemas acuáticos ya que causan efectos negativos sobre la biota que habita en ellos, como las microalgas, organismos fundamentales para las cadenas tróficas de estos ecosistemas contribuyendo al balance de oxígeno y son las iniciadoras del flujo de energía en estos ambientes. Estos compuestos no se degradan completamente tras su utilización por lo que pueden alcanzar fácilmente grandes hábitats acuáticos. Actualmente, la solución micelar es un producto de uso personal muy utilizado por el ser humano para la retirada de los productos de maquillaje que utilizan a modo de mejorar su imagen. Por otro lado, las mascarillas son productos muy utilizados en estos últimos años de pandemia y que, en algunas ocasiones no se recicla de la manera adecuada y puede alcanzar también estos hábitats acuáticos.

En este trabajo se llevaron a cabo diferentes estudios para comprobar si estos dos productos causan un efecto tóxico sobre *Raphidocelis subcapitata*, microalga dulceacuícola con una elevada sensibilidad hacia compuestos tóxicos. Para ello, se estudiaron una serie de parámetros que nos pueden indicar con facilidad si realmente estos productos de uso personal causan un efecto tóxico sobre estos organismos y si estos son agravados con las variaciones luminosas que tienen lugar durante el año. Estos parámetros son, la viabilidad celular, la tasa de crecimiento y la actividad fotosintética de los individuos tras someterlos a los distintos tratamientos de este estudio. Se calculó también la concentración efectiva de solución micelar que inhibe un 50% el crecimiento de la microalga (EC50).

Tras el análisis de los resultados obtenidos se puede ver una interacción negativa entre el aumento de la intensidad de luz y la acción tóxica de la solución micelar (p -valor = 0,004), existiendo por lo tanto toxicidad por parte de la solución micelar hacia *Raphidocelis subcapitata*. El efecto tóxico tiene efecto en todos los parámetros mencionados anteriormente. Sin embargo, no se aprecia ningún efecto tóxico por parte de las mascarillas en ninguno de los casos.

Con estos resultados se puede concluir que el agua micelar está compuesta por sustancias que pueden causar toxicidad en medios acuáticos, agravándose durante las épocas de mayor intensidad lumínica, por lo que, es necesario un buen empleo de este tipo de productos para que no puedan causar efectos negativos en hábitats acuáticos y, así, evitar posibles efectos negativos futuros hacia el ser humano.

Palabras clave: Contaminante emergente, citotoxicidad, mascarilla, microalga, solución micelar.

Os contaminantes emerxentes, como o auga micelar (solución micelar), son compostos tóxicos para os ecosistemas acuáticos xa que causan efectos negativos sobre a biota que habita neles, como as microalgas, organismos fundamentais para as cadeas tróficas destes ecosistemas contribuíndo ao balance de osíxeno e son as iniciadoras do fluxo de enerxía nestes ambientes. Estes compostos non se degradan completamente tras a súa utilización polo que poden alcanzar facilmente grandes hábitats acuáticos. Actualmente, a solución micelar é un produto de uso persoal moi utilizado polo ser humano para a retirada dos produtos de maquillaxe que utilizan a modo de mellorar a súa imaxe. Doutra banda, as máscaras son produtos moi utilizados nestes últimos anos de pandemia e que, nalgunhas ocasións non se recicla da maneira adecuada e pode alcanzar tamén estes hábitats acuáticos.

Neste traballo levaron a cabo diferentes estudos para comprobar se estes dous produtos causan un efecto tóxico sobre *Raphidocelis subcapitata*, microalga dulceacuícola cunha elevada sensibilidade cara a compostos tóxicos. Para iso, estudáronse unha serie de parámetros que nos poden indicar con facilidade se realmente estes produtos de uso persoal causan un efecto tóxico sobre estes organismos e se estes son agravados coas variacións luminosas que teñen lugar durante o ano. Estes parámetros son, a viabilidade celular, a taxa de crecemento e a actividade fotosintética dos individuos tras sometelos aos distintos tratamentos deste estudo. Calculouse tamén a concentración efectiva de solución micelar que inhibe un 50% o crecemento da microalga (EC50).

Tras o análise dos resultados obtidos pódese ver unha interacción negativa entre o aumento da intensidade de luz e a acción tóxica da solución micelar (p-valor = 0,004), existindo por tanto toxicidade por parte da solución micelar cara a *Raphidocelis subcapitata*. O efecto tóxico ten efecto en todos os parámetros mencionados anteriormente.

Con todo, non se aprecia ningún efecto tóxico por parte das máscaras en ningún dos casos. Con estes resultados pódese concluír que a auga micelar está composta por substancias que poden causar toxicidade en medios acuáticos, agravándose durante as épocas de maior intensidade lumínica, polo que, é necesario un bo emprego deste tipo de produtos para que non poidan causar efectos negativos en hábitats acuáticos e, así, evitar posibles efectos negativos futuros cara ao ser humano.

Palabras clave: Contaminante emergente, citotoxicidad, máscara, microalga, solución micelar.

Emerging contaminants, such as micellar water (micellar solution), are toxic compounds for aquatic ecosystems as they cause negative effects on the biota that inhabit them, such as microalgae, organisms that are fundamental to the trophic chains of these ecosystems, contributing to the balance of oxygen and are the initiators of the flow of energy in these environments. These compounds do not degrade completely after use and can easily reach large aquatic habitats. Currently, micellar solution is a product of personal use widely used by humans for the removal of make-up products that they use to improve their image. On the other hand, masks are products that have been widely used in the last few years of the pandemic and which, on some occasions, are not recycled properly and can also reach these aquatic habitats.

In this work they carried out different studies to check if these two products cause a toxic effect on *Raphidocelis subcapitata*, a freshwater microalgae with a high sensitivity to toxic compounds. For this purpose, we studied a series of parameters that can easily indicate whether these products for personal use really cause a toxic effect on these organisms and whether these are aggravated by the light variations that take place during the year. These parameters are cell viability, growth rate and photosynthetic activity of the individuals after subjecting them to the different treatments of this study. The effective concentration of micellar solution that inhibits the growth of the microalgae by 50% (EC50) was also calculated.

After the analysis of the results obtained, we could see a negative interaction between the increase of light intensity and the toxic action of the micellar solution (p -value = 0.004), therefore there was toxicity of the micellar solution towards *Raphidocelis subcapitata*. The toxic effect has an effect on all the parameters mentioned above. However, no toxic effect of the masks was observed in any of the cases.

With these results it can be concluded that micellar water is composed of substances that can cause toxicity in aquatic environments, worsening during periods of higher light intensity, so it is necessary a good use of this type of products so that they can not cause negative effects in aquatic habitats and, thus, avoid possible future negative effects to humans.

Key words: Emerging contaminant, cytotoxicity, mask, micralga, micellar solution.

INTRODUCCIÓN

Las algas y microalgas son un componente fundamental en el medio ambiente acuático, ya que son las principales productoras de oxígeno y de materia orgánica. Actualmente las microalgas son muy utilizadas en los estudios de toxicidad, ya que, muchas especies, presentan una sensibilidad a sustancias tóxicas superior al del resto de organismos (Suzuki, S. *et al.* 2018). La microalga que se utilizará en el siguiente trabajo es *Raphidocelis subcapitata*.

El potencial efecto tóxico de los contaminantes emergentes preocupa con respecto a la salud humana y ambiental (Galindo-Miranda, J. M. *et al.* 2019). Esto es así debido a que estos contaminantes pueden causar un gran efecto dañino incluso en pequeñas cantidades (Galindo-Miranda, J. M. *et al.* 2019). Los contaminantes emergentes conforman una gran lista de productos que se usan diariamente como, por ejemplo, hormonas, pesticidas, productos de cuidado personal (PCP) y productos farmacéuticos (Galindo-Miranda, J. M. *et al.* 2019).

Los contaminantes emergentes son compuestos de distinto origen y naturaleza química, de los cuales existe información limitada y que todavía no se encuentran regulados por los reglamentos de calidad de agua existentes actualmente, pudiendo ser amenazas potenciales para los ecosistemas y para la salud y seguridad humana (Farré *et al.* 2008). La aparición de estos contaminantes en aguas superficiales puede ser preocupante ya que se han encontrado este tipo de compuestos en sistemas de agua de todo el mundo, ya sean lagos, ríos o embalses, aguas costeras y oceánicas e incluso en la Antártida (Galindo-Miranda, J. M. *et al.* 2019).

El contaminante emergente elegido para este ensayo es el agua micelar, producto de uso personal compuesto principalmente por tensioactivos, hidrocarburos y agua. Además, como su nombre indica, se caracteriza por formar micelas, estructuras complejas de agentes limpiadores que adoptan la forma de una microesfera invisible. Están formadas por dos extremos: un extremo hidrófilo soluble en agua y un extremo lipófilo que atrapa las materias grasas que son incompatibles con el agua (Pasqualí, R. *et al.* 2005). En el presente trabajo se ha seleccionado como representación de una mezcla compleja de

sustancias, dado que si alguna de ellas llega a habitats acuáticos puede causar efectos tóxicos sobre los organismos de ese medio y, a su vez, afectar indirecta o directamente al ser humano. La composición del agua micelar utilizado es la siguiente: agua termal de avena, pentileno glicol, peg-6 glicéridos caprílicos/cápricos, bromuro de cetrimonio, edta disódico, fragancia, peg-40 aceite de ricino hidrogenado. goma de esclerocio y cloruro de sodio. En algunos estudios se observó un comportamiento tóxico hacia *Dunaliella salina* por parte de uno de estos componentes del agua micelar, el bromuro de cetrimonio (Alexandre, A. *et al.* 2016).

Las mascarillas se han convertido en un instrumento fundamental de protección individual y colectiva frente a la infección por SARS-CoV-2 en estos últimos años de pandemia del covid-19. En cuanto a su composición, para la elaboración de las mascarillas quirúrgicas se utiliza habitualmente celulosa o polipropeno. Estos materiales se convierten en fibras que se superponen para crear una tela no tejida. Debido a la necesidad de su uso diario y a causa de un mal reciclaje, mascarillas, o fragmentos de las mismas, pueden llegar a medios acuáticos, por lo que resulta interesante conocer la potencial toxicidad que puedan ejercer sobre los habitantes de dichos ecosistemas.

Otro aspecto importante de estudio es la posible interacción del efecto tóxico de los contaminantes ensayados, agua micelar y mascarillas, con las condiciones ambientales de los medios naturales, entre ellas la luz, un factor fundamental para el crecimiento de organismos fotosintéticos como las microalgas. Por ello, en este estudio, se aplicarán distintas intensidades de luz intentando simular las condiciones de luz de invierno ($80 \mu\text{mol fotón m}^{-2} \text{s}^{-1}$) y unas condiciones asimilables a un mediodía de verano ($300 \mu\text{mol fotón m}^{-2} \text{s}^{-1}$) en la región geográfica de Galicia.

A vista de lo expuesto, este trabajo de fin de grado se ha centrado en la posible acción tóxica de la solución micelar, cuyos componentes pueden aparecer como contaminantes emergentes del grupo de los productos de uso personal utilizado por el ser humano para eliminar restos de maquillaje de la cara, y las mascarillas quirúrgicas, muy utilizadas en estos últimos años de pandemia sobre microalgas de agua dulce de la especie *Raphidocelis subcapitata*.

OBJETIVOS

El objetivo principal de este trabajo es el estudio de la citotoxicidad de dos contaminantes, una solución micelar y fragmentos de mascarillas quirúrgicas, individualmente y en combinación, sobre la microalga dulceacuícola *Raphidocelis subcapitata*. Del mismo modo, también se estudió el potencial efecto modulador de la intensidad luminosa sobre dicha citotoxicidad.

Para dicho estudio, los parámetros de citotoxicidad ensayados fueron la tasa de crecimiento, la viabilidad celular y la actividad fotosintética de células microalgales sometidas a los distintos tratamientos.

MATERIAL Y MÉTODOS

Descripción de *Raphidocelis subcapitata*.

La especie *Raphidocelis subcapitata* es actualmente utilizada en los bioensayos de toxicidad, ya que presenta una elevada sensibilidad frente a sustancias tóxicas y unas tasas de crecimiento elevadas con respecto a las otras especies de microalgas (Suzuki, S. et al. 2018). Se trata de una microalga de agua dulce, que pertenece al filo Chlorophyta, Clase Chlorophyceae, Orden Sphaeropleales y Familia Selenastraceae (AlgaeBase).

Las células de la especie *Raphidocelis subcapitata* presentan una forma curvada, que recuerda a una luna creciente. Las células suelen presentarse de forma solitaria y su eje mayor varía entre 8 y 14 μm , mientras que su eje menor oscila entre los 2 y 3 μm . En cuanto a su reproducción, presentan una reproducción asexual por autoesporas liberadas por la ruptura de la pared celular (AlgaeBase).

Cultivo de *Raphidocelis subcapitata*.

Para realizar los cultivos de *Raphidocelis subcapitata* se utilizó el medio de cultivo GoldMedium Fresh-Water Species (GM-FWS).

Todos los cultivos stock se realizaron en botellas pyrex de 500 mL, a partir de los cuales tomamos las cantidades necesarias para realizar las experiencias del estudio. Estos cultivos se mantuvieron a una temperatura de $18^{\circ}\text{C} \pm 2$ en una cámara de cultivo.

Por otro lado, los cultivos experimentales sometidos a los distintos tratamientos durante este estudio se llevaron a cabo en reactores, eliminando bacterias y manteniendo el cultivo axénico mediante el uso de filtros con un tamaño de poro de 0,22 μm . Los reactores son tubos cilíndricos con un volumen máximo de 100 mL en los cuales se ocupaba un volumen de 60 mL en todos los cultivos realizados (Figura 1). Además, todos los cultivos utilizados para llevar a cabo los tratamientos se empezaron con la misma densidad celular, de 150.000 cel/mL.

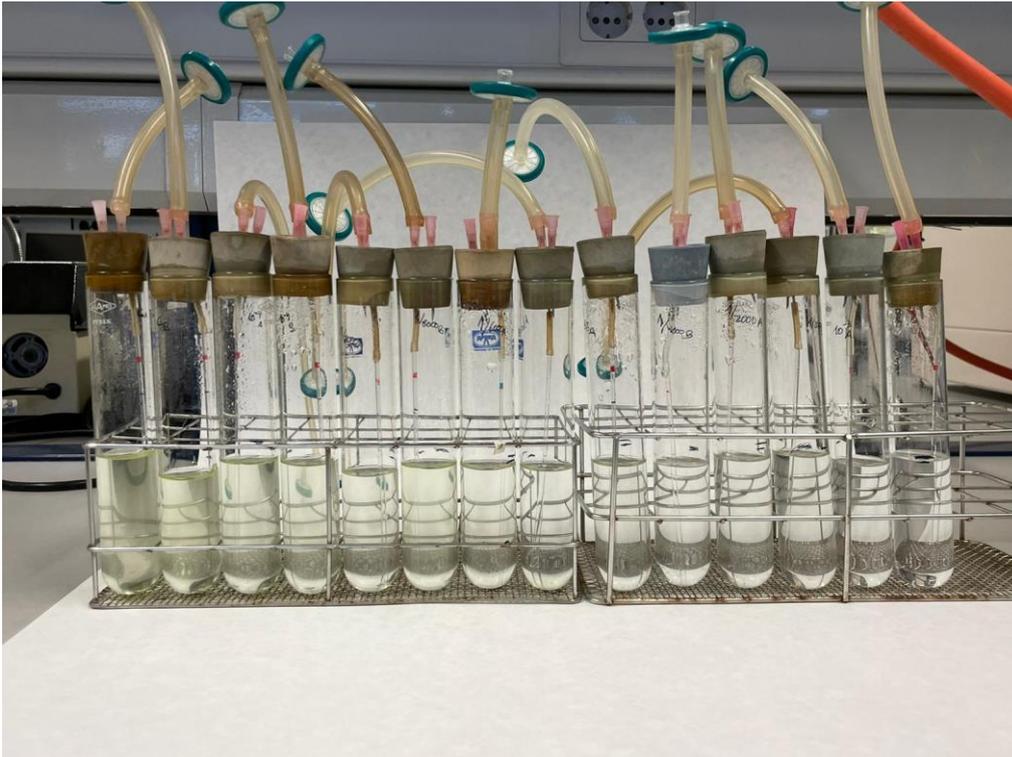


Fig 1: Imagen de los reactores utilizados para realizar los cultivos.

Determinación de la densidad celular y cálculo de la tasa de crecimiento.

El uso de cámaras de recuento es una técnica muy utilizada para los cálculos de densidad celular de un cultivo. En este caso utilizamos la cámara de Neubauer, con una superficie de 1 mm^2 y una profundidad de 0,1 mm. Una vez realizado el conteo en la cámara se realiza una estimación de la densidad celular en base a la siguiente fórmula:

$$\text{Densidad} = \frac{\text{N}^{\circ} \text{ de células contadas}}{\text{Superficie de conteo (mm}^2\text{)} \times \text{Profundidad (mm)} \times \text{Dilución}}$$

Una vez obtenida la densidad celular aplicaremos las siguientes fórmulas para la obtención de la tasa de crecimiento de los distintos tratamientos:

$$\mu = \frac{\ln N_t - \ln N_0}{\ln 2(t - t_0)}$$

siendo:

- N_t : Densidad celular en el tiempo t .
- N_0 : Densidad celular inicial, en t_0 .
- t : tiempo en días.

La tasa de crecimiento se expresa en día⁻¹.

Determinación de la viabilidad celular.

El análisis de la viabilidad de las células de *Raphidocelis subcapitata* expuestas a los distintos tratamientos de este estudio se llevó a cabo mediante citometría de flujo empleando el yoduro de propidio. Este fluorocromo es un compuesto fluorescente que no es capaz de atravesar la membrana plasmática de células vivas debido a su polaridad y carga. Sin embargo, es capaz de atravesar la membrana citoplasmática de células muertas y, gracias a su capacidad de intercalarse en las cadenas dobles de ácidos nucleicos, es una buena alternativa para el estudio de la viabilidad celular (Buysschaert, B *et al.* 2016).

Para este análisis se extraen 500 μL de cada una de las réplicas de cada tratamiento (ajustándose previamente a 150.000 cel/mL con tampón fosfato salino) y se añaden 2 μL de yoduro de propidio de una solución stock a 1mg/mL. Una vez añadido del fluorocromo se mantienen estas alícuotas en oscuridad durante 10 minutos para su posterior análisis en un citómetro CytoFlex de Beckman Coulter equipado con láseres de excitación de 488 nm y 633 nm, detectores de dispersión de luz frontal (FS) y lateral (SS) y cuatro detectores de fluorescencia correspondientes a diferentes intervalos de longitud de onda: 505-550 nm (FL1), 550-600 nm (FL2), 600-645 nm (FL3) y >645 nm (FL4) (Esperanza *et al.* 2019). Para cada réplica se analizaron siempre 10.000 células seleccionadas en base a su tamaño (detector FS) y complejidad celular (detector SS). En el detector FL3 y en escala logarítmica, se analizan los resultados correspondientes a las células de yoduro de propidio (PI-), es decir, aquellas células en las que el fluorocromo no fue capaz de atravesar la membrana, considerándose por lo tanto, células vivas, expresado como % de células vivas.

Análisis de la actividad fotosintética del cultivo.

Para llevar a cabo el estudio de la actividad fotosintética de las células de *Raphidocelis subcapitata* sometidas a los distintos tratamientos se utilizó un fluorímetro AquaPen-C-AP-100 como herramienta de medida de la actividad del fotosistema II (PSII). Este equipo consta de un lector de cubetas (con capacidad máxima de 3 mL), una fuente de luz LED azul (455 nm) que es capaz de excitar la clorofila y otra fuente de luz roja (620 nm) que es capaz de producir la excitación de la ficobilina.

Previamente al uso del fluorímetro se extraen 5 mL de alícuota de cada una de las réplicas de los tratamientos, se ajustan a una densidad de 150.000 cel/mL con tampón fosfato salino y se someten durante 30 minutos a oscuridad. Una vez transcurrido ese tiempo se procede a la medición de su actividad fotosintética.

Diseño experimental.

Este estudio se basa en determinar si existe algún efecto tóxico por parte de las soluciones micelares utilizadas por el ser humano para eliminar restos de maquillaje y/o por parte de las mascarillas quirúrgicas hacia una especie concreta de microalga, *Raphidocelis subcapitata*.

Lo primero que se hizo en este estudio fue la determinación de la EC50, (la mitad de la concentración efectiva máxima). Para ello, se expuso a la población de *Raphidocelis subcapitata* a diferentes diluciones de la solución micelar (1/1000, 1/2000, 1/4000, 1/6000, 1/8000 y 1/10000), cultivando dos replicas por cada concentración y realizando un conteo (cámara de Neubauer) de la densidad poblacional a las 48 y 120 horas. Una vez estimadas las densidades poblacionales para cada uno de los cultivos realizados, se calculó la EC50 a las 120 horas de exposición (1/5300) gracias al uso de un software libre llamado Compusyn.

En el momento que se obtuvo el valor de la EC50, se comenzó con el interés principal de este estudio. Se sometió a la población de *Raphidocelis subcapitata* a 2 distintas condiciones de cultivo. En la primera, con unas condiciones de luz bajas ($80 \mu\text{mol fotón m}^{-2} \text{s}^{-1}$), se elaboraron 3 tratamientos (C+M, EC50 y EC50+M) y un control (C), siendo este un cultivo normal de *Raphidocelis subcapitata*, es decir, un cultivo creciendo en condiciones normales, sin ser expuesto a ningún tipo de tratamiento. Un tratamiento en el que solo se expone a la población a la mascarilla (C+M), otro en el que se realiza el cultivo en presencia únicamente de la solución micelar (EC50) y, por último, un tratamiento en el que se somete

a la población a un efecto combinado de los dos agentes de estudio, mascarilla y solución micelar (EC50+M). En la segunda se elaboran los mismos tratamientos, junto con el control, que en la otra condición de crecimiento explicada anteriormente, solo hay una excepción, se aumenta la intensidad de luz ($300 \mu\text{mol fotón m}^{-2} \text{s}^{-1}$).

Comercialmente, las mascarillas se obtuvieron en una farmacia de A Coruña. En el caso de los tratamientos que incluyen mascarilla, en todos se añadieron 0,15 g de mascarilla cortada en cuadrados de, aproximadamente 3 ± 1 mm de lado cortada empleando unas tijeras previamente esterilizadas con alcohol.

Todos los ensayos se repitieron 2 veces, realizándose siempre 2 réplicas biológicas por condición experimental.

Tanto a las 48 como a las 120 horas de exposición se determinó la densidad celular mediante el uso de la cámara de Neubauer, la viabilidad celular de los cultivos mediante el uso de la citometría de flujo (empleando el fluorocromo yoduro de propidio) y la actividad fotosintética de los cultivos.

Análisis estadístico.

Para cada uno de los parámetros estudiados (tasa de crecimiento, actividad fotosintética y viabilidad celular) se calculan las medias y las desviaciones estándar de las réplicas realizadas en cada uno de los tratamientos y en el control. La obtención de datos se llevó a cabo utilizando el software IBM SPSS Statistics y realizando estudios de la varianza con dos tipos de ANOVA diferentes, un ANOVA de una vía (utilizando como test post-hoc el test de Tukey, mostrando los resultados en la figura 3, figura 4 y figura 5) para valorar si existían diferencias significativas entre las medias de las réplicas de cada tratamiento.

Por otro lado, utilizando el mismo software anteriormente nombrado, se llevó a cabo un análisis de la varianza (ANOVA) de tres vías para estudiar las potenciales interacciones causadas por la combinación de tres factores, la intensidad luminosa (alta o baja), la loción (si se incluye en el cultivo o no la solución micelar) y la mascarilla (si se incluye o no la mascarilla en el cultivo).

En ambos casos se valora la hipótesis con un nivel de confianza de un 95%. En el caso del ANOVA de una vía donde se realiza también el test de Tukey, este se aplica con un nivel de significación (p-valor) del 0,05 en todos los casos.

Los resultados del test de Tukey se muestran en las gráficas en forma de letras, siendo la a un resultado de p-valor $> 0,05$ y, por lo tanto, no existiendo diferencias entre ese tratamiento y el control. La letra b equivale a un resultado de p-valor $< 0,05$ y marca la existencia de diferencias significativas entre los resultados de ese tratamiento y el control.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Cálculo de la EC50.

Tras la obtención de resultados se ve como los valores de la tasa de crecimiento de los distintos tratamientos son menores a las tasas de crecimiento del control tanto a las 48 horas como a las 120 horas (p-valor = 0,0001). Por otro lado, se puede observar como las tasas de crecimiento también disminuyen gradualmente a medida que se aumenta la concentración del tratamiento, en este caso la solución micelar. Los resultados se muestran en la figura 2.

Tras la introducción de los resultados en el software libre Compusyn, se obtuvo como resultado para la EC50 la concentración 1/5300.

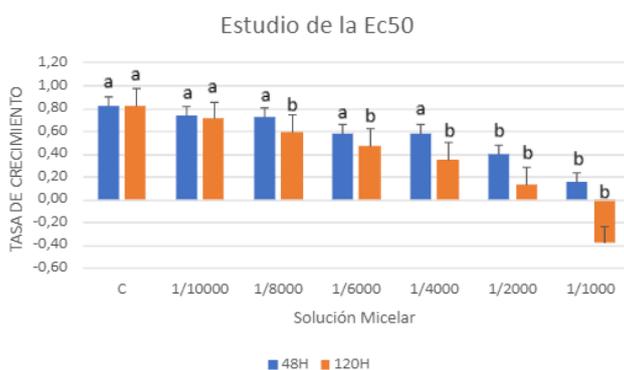


Fig 2: Eje de la Y los valores de la tasa de crecimiento expresados en día⁻¹ y el eje de las X las distintas concentraciones de la solución micelar. Además, se realiza una distinción entre los valores a las 48 horas (en azul) y a las 120 horas (en naranja).

Efecto de los tratamientos sobre la tasa de crecimiento de *Raphidocelis subcapitata*.

Pese a que actualmente están surgiendo nuevos biomarcadores para el estudio ecotóxico, la obtención de la densidad celular para el posterior cálculo y análisis de la tasa de crecimiento sigue siendo un parámetro muy utilizado en los estudios de ecotoxicidad (Van Wezel y Van Vlaardingen, 2004).

Los resultados obtenidos en este estudio dejan ver que existe una interacción negativa para el crecimiento de la microalga dulceacuícola *Raphidocelis subcapitata* entre la intensidad luminosa y la solución micelar (p-valor = 0,004) cuando se llega a las 120 horas de exposición. Por otro lado, también se aprecia que llegadas las 48 horas de exposición todavía no existe ninguna interacción significativa entre los factores de estudio (Figura 3).

En cuanto a los resultados obtenidos para los tratamientos con solamente la EC50, se puede apreciar que se produce un aumento del efecto cuanto más tiempo se encuentren las células expuestas a ella. Sin embargo, el factor clave para que el componente tóxico del agua micelar pueda causar toxicidad sobre las microalgas es la intensidad de luz. A intensidades de luz bajas no se aprecia una afectación tóxica por parte de la EC50, al contrario que en intensidades de luz altas, donde se aprecia una diferencia significativa entre los resultados obtenidos para la EC50 y el control (p-valor = 0,004).

Si se analizan los resultados obtenidos para los tratamientos sometidos únicamente al efecto de la mascarilla, se puede observar como no hay un efecto significativo de la mascarilla sobre la tasa de crecimiento de *Raphidocelis subcapitata* (p-valor = 0,551). Sin embargo, en algunos estudios si se observaron cambios negativos en la tasa de crecimiento del alga marina *Phaeodactylum tricornutum* causados por la liberación de un gran número de microfibras por parte de las mascarillas al estar expuestas a radiación ultravioleta (Sendra, M. *et al.* 2022).

Para el último tratamiento, donde las células tuvieron que crecer expuestas a ambos agentes al mismo tiempo, mascarilla y solución micelar, se obtuvieron datos de gran interés. A las 48 horas no se aprecia ningún efecto significativo en ningún caso (p-valor = 0,551 y p-valor = 0,316). Sin embargo, si se aprecia un efecto significativo por parte de este tratamiento a las 120 horas de exposición, aunque únicamente en intensidades altas de luz (p-valor = 0,038).

Por otro lado, en intensidades luminosas altas, apreciamos cambios significativos a las 120 horas de exposición con respecto al control, existiendo un claro descenso en la tasa de crecimiento de *Raphidocelis subcapitata* en presencia de la solución micelar (p -valor = 0,004) y en presencia tanto de la solución micelar como de la mascarilla (p -valor = 0,038). Sin embargo, no se encuentran diferencias entre los resultados a las 48 horas de exposición (p -valor = 0,316) Los datos se muestran en la figura 3.

Al contrario, a condiciones de baja intensidad lumínica, no se aprecian diferencias significativas entre ninguna de las medias, ni a las 48 horas (p -valor = 0,551) ni a las 120 horas (p -valor = 0,187).

Con estos resultados se puede afirmar que los componentes del producto de uso personal utilizado en este estudio causan un efecto tóxico sobre el crecimiento de la microalga dulceacuícola *Raphidocelis subcapitata*. Además, en otros estudios también se observó una disminución del crecimiento de ciertas microalgas causado por otro tipo de contaminantes (Rempel, A. et al. 2021) como el bisphenol A (Esperanza et al. 2021) o como el nonylphenol y los microplásticos (Wenfeng Yang et al. 2020).

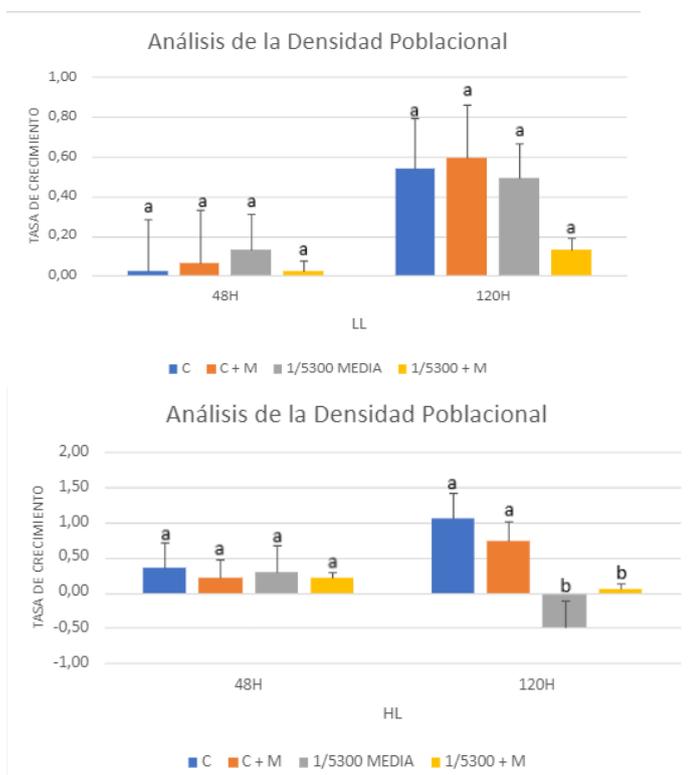


Fig 3: En el eje de la Y se muestran los valores de las tasas de crecimiento para los distintos posibles agentes tóxicos y en el eje de la X se muestran los períodos de tiempo esperados para cada conteo de población, siendo 48 horas y 120 horas. Por otro lado, se muestra la diferencia entre las intensidades de luz, LL (baja intensidad) y HL (alta intensidad). Por último, se muestran los distintos tratamientos, el control (en azul), solamente expuestos a la mascarilla (en naranja), solamente expuestos a la solución micelar (en gris) y expuestos a ambos tratamientos mascarilla y solución micelar al mismo tiempo (en amarillo).

Efecto de los tratamientos sobre la viabilidad celular de *Raphidocelis subcapitata*.

El análisis de la viabilidad celular es un parámetro muy utilizado en los estudios de ecotoxicología de los últimos años con microalgas (An, S. A. et al. 2021).

En el apartado anterior se observó como la interacción luz-solución micelar causa efectos negativos sobre el crecimiento celular de *Raphidocelis subcapitata*. Con el fin de proporcionar más datos que afirmen estos resultados se procedió al estudio de la viabilidad celular para los distintos tratamientos.

Con estos resultados, los cuales se pueden ver en la figura 4, se confirma que existe ese efecto negativo también sobre la viabilidad celular por parte del tratamiento de la EC50 (p-valor = 0,004) llegadas las 120 horas de exposición con una alta intensidad de luz. No se encuentra esta interacción a las 48 horas (p-valor = 0,438). Los datos se muestran en la Figura 4.

Analizando las diferencias entre los resultados obtenidos para los diferentes tratamientos con respecto al control, solo se confirma la diferencia significativa entre los resultados para el tratamiento en el que exclusivamente se somete a los individuos a la presencia de la solución micelar (p-valor = 0,0001) llegadas las 120 horas.

En cuanto al efecto de la mascarilla, no se encuentra ningún cambio significativo en la viabilidad celular de los cultivos sometidos al tratamiento con mascarilla (p-valor = 0,485).

A diferencia de la tasa de crecimiento, la viabilidad no se ve afectada cuando se combinan los tratamientos en ningún caso (p-valor = 0,379).

No se encuentran diferencias significativas entre los resultados de los tratamientos sometidos a bajas condiciones de luz (p-valor = 0,271 a las 48 horas y p-valor = 0,223 a las 120 horas) y tampoco se aprecian entre los resultados obtenidos a las 48 horas (p-valor = 0,438) a una alta intensidad lumínica.

Otros artículos apoyan el efecto negativo sobre la viabilidad celular de ciertas microalgas de algunos contaminantes como el tetrabromobisphenol A (Debenest, T. et al. 2011) o como el bisphenol A (Esperanza et al. 2021).

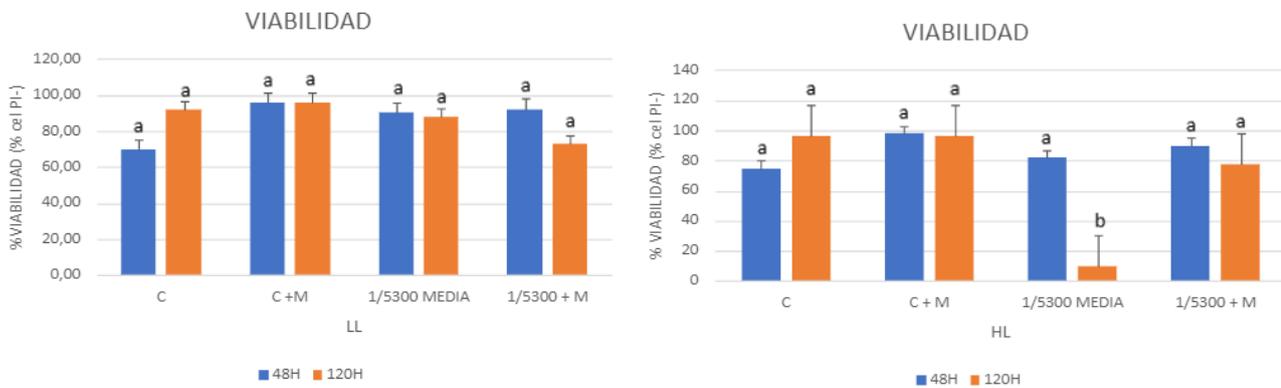


Fig 4: Valores de la viabilidad celular de los individuos de *Raphidocelis subcapitata* que fueron capaces de reproducirse en cada uno de los tratamientos. En el eje de la Y se muestran los valores (en %) de las células PI-, es decir, de las células vivas en cada cultivo. En el eje de la X se muestran los distintos tratamientos distinguiendo entre intensidades bajas de luz (LL) e intensidades altas de luz (HL). Además también se marca la diferencia entre los dos tiempos de toma de datos 48 horas (en azul) y 120 horas (en naranja).

Efecto de los tratamientos sobre la actividad fotosintética de *Raphidocelis subcapitata*.

Por último, y para seguir profundizando en los resultados obtenidos en los apartados anteriores se llevó a cabo el análisis de la actividad fotosintética de los individuos de *Raphidocelis subcapitata* en cada uno de los tratamientos.

Tras la obtención y el análisis de los resultados se confirma también la interacción negativa entre la intensidad luminosa y la solución micelar sobre la capacidad fotosintética de *Raphidocelis subcapitata* llegadas las 120 horas de exposición (p-valor = 0,002).

Comparando las medias de las réplicas de cada tratamiento con respecto al control se confirma la diferencia significativa de los resultados obtenidos en presencia de la EC50 con intensidades luminosas altas llegadas las 120 horas de exposición (p-valor = 0,034). No se encuentran diferencias significativas entre los valores obtenidos para las bajas intensidades luminosas y su correspondiente control (p-valor = 0,076 para las 48 horas y p-valor = 0,135 a las 120 horas). Tampoco a las 48 horas de exposición a altas intensidades de luz (p-valor = 0,561). Los resultados obtenidos se muestran en la figura 5.

Esta toxicidad también puede ser causada por otro tipo de contaminantes como los microplásticos y el nonilfenol sobre otras especies de microalgas como *Chlorella pyrenoidosa* (Wenfeng Yang, et al. 2020).

Tras los resultados obtenidos se puede decir que el agua micelar contiene sustancias que son tóxicas frente a las microalgas y que si están expuestas a unas intensidades de luz

altas esta se agrava. Por otro lado, la mascarilla no causa efectos tóxicos por sí misma, sin embargo, sí que presenta toxicidad en combinación con el agua micelar.

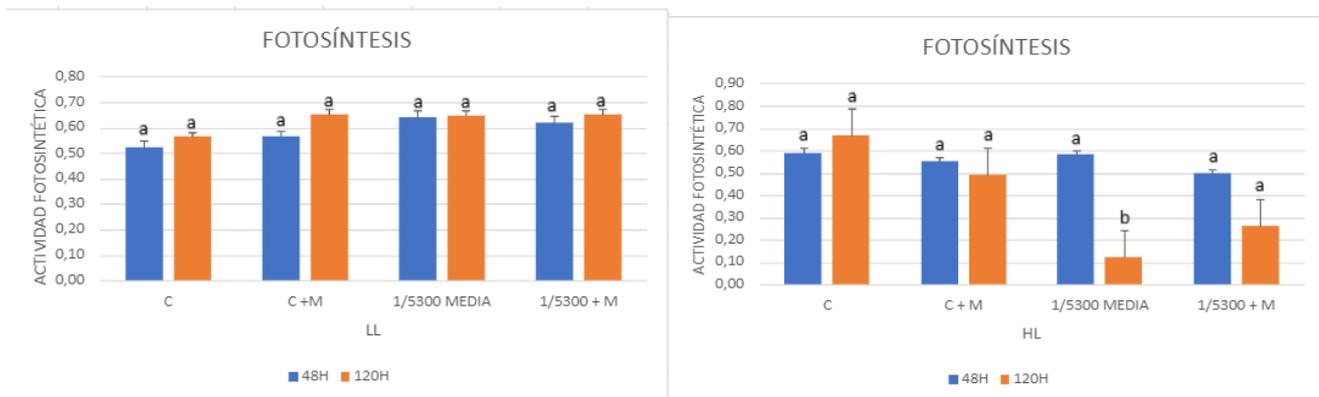


Fig 5: Análisis de la actividad fotosintética de *Raphidocelis subcapitata* en los diferentes tratamientos. En el eje de la Y se expresan los valores de actividad fotosintética obtenidos con el fluorímetro. En el eje de la X se muestran los distintos tratamientos distinguiendo entre baja intensidad luminosa (LL) y alta intensidad luminosa (HL). Además, también se marca la diferencia entre los dos tiempos de toma de datos 48 horas (en azul) y 120 horas (en naranja). Las letras hacen referencia al análisis estadístico siendo a (no existen diferencias significativas) y b (si existen diferencias significativas).

CONCLUSIONES / CONCLUSIÓNS / CONCLUSIONS

La dilución de solución micelar equivalente al valor de EC50 obtenida fue 1/5.300. En esta concentración se inhibe al 50% la tasa de crecimiento de los cultivos de *Raphidocelis subcapitata*.

La loción micelar afecta negativamente sobre la tasa de crecimiento, la viabilidad y la actividad fotosintética de las células de *Raphidocelis subcapitata* cuando se aumenta la intensidad de luz a la que se exponen.

La mascarilla es capaz de mitigar ligeramente los efectos tóxicos de la solución micelar con intensidades de luz altas, provocando que haya valores más bajos de viabilidad, crecimiento y actividad fotosintética con respecto al control, pero que no llegue a causar pérdida de la viabilidad de las células. Sin embargo, no es capaz de causar toxicidad por sí misma en ningún caso.

A dilución de solución micelar equivalente ao valor de EC50 obtida foi 1/5.300. Nesta concentración inhíbese ao 50% a taxa de crecemento dos cultivos de *Raphidocelis subcapitata*.

A loción micelar afecta negativamente sobre a taxa de crecemento, a viabilidade e a actividade fotosintética das células de *Raphidocelis subcapitata* cando se aumenta a intensidade de luz á que se expoñen.

A máscara é capaz de mitigar lixeiramente os efectos tóxicos da solución micelar con intensidades de luz altas, provocando que haxa valores máis baixos de viabilidade, crecemento e actividade fotosintética con respecto ao control, pero que non chegue a causar perda da viabilidade das células. Con todo, non é capaz de causar toxicidade por si mesma en ningún caso.

The dilution of micellar solution equivalent to the EC50 value obtained was 1/5,300. This concentration inhibits the growth rate of *Raphidocelis subcapitata* cultures by 50%.

The micellar lotion negatively affects the growth rate, viability and photosynthetic activity of *Raphidocelis subcapitata* cells when the intensity of the light to which they are exposed increases.

The mask is able to slightly mitigate the toxic effects of the micellar solution at high light intensities, causing it to have lower values of viability, growth and photosynthetic activity compared to the control, but not to cause loss of cell viability. However, it is not capable of causing toxicity by itself in any case.

BIBLIOGRAFÍA

- Alexander A. Golubev, Artur Y. Prilepskii, Lev A. Dykman, Nikolai G. Khlebtsov, Vladimir A. Bogatyrev**, Colorimetric Evaluation of the Viability of the Microalga *Dunaliella Salina* as a Test Tool for Nanomaterial Toxicity, *Toxicological Sciences*, Volume 151, Issue 1, Pages 115–125, (2016).
- AlgaeBase**, https://www.algaebase.org/search/genus/detail/?genus_id=43448 (visitado el 19-07-2022).
- An, S. A. et al.** Identification of potential toxicants in sediments from an industrialized area in Pohang, South Korea: Application of a cell viability assay of microalgae using flow cytometry. *J. Hazard. Mater.* **405**, 124230 (2021).
- Buysschaert, B., Byloos, B., Leys, N. et al.** Reevaluating multicolor flow cytometry to assess microbial viability. *Appl Microbiol Biotechnol* 100, 9037–9051 (2016).
- Castañeda, M. B.** Procesamiento de datos y análisis estadísticos utilizando SPSS: Un libro práctico para investigadores y administradores educativos. Edipucrs, (2010).
- Debenest, T., Petit, A.N., Gagné, F., Kohli, M., Nguyen, N., Blaise, C.** Comparative toxicity of a brominated flame retardant (tetrabromobisphenol A) on microalgae with single and multi-species bioassays. *Chemosphere* 85, 50–55, (2011).
- Farré, M.I., Pérez, S., Kantiani, L., & Barceló, D.** Fate and toxicity of emerging pollutants, their metabolites and transformation products in the aquatic environment. *Trends in Analytical Chemistry*. 27: 991-1007, (2008).
- Galindo-Miranda, J. M. et al.** Occurrence of emerging contaminants in environmental surface waters and their analytical methodology - A review. *Water Sci. Technol. Water Supply* 19, 1871–1884 (2019).
- Gallego Albiach, V.; Pérez Igualada, LM.** Estimación de la densidad celular mediante el uso de cámaras de recuento. (2021).
- Marta Seoane, Ángeles Cid, Marta Esperanza.** Toxicity of bisphenol A on marine microalgae: Single- and multispecies bioassays based on equivalent initial cell biovolume. *Science of The Total Environment*. Volume 767, (2021).

- Marta Esperanza, Marta Seoane, Carmen Rioboo, Concepción Herrero, Ángeles Cid,** Differential toxicity of the UV-filters BP-3 and BP-4 in *Chlamydomonas reinhardtii*: A flow cytometric approach, *Science of The Total Environment*, Volume 669, Pages 412-420, (2019).
- Pasqualí, R. C., Bregni, C., & Serrao, R.** Geometría de micelas y otros agregados de sustancias anfífilas. *Acta Farm. Bonaerense*, 24(1), 19-30, (2005).
- P.F.M. Nogueira, D. Nakabayashi, V. Zucolotto.** The effects of graphene oxide on green algae *Raphidocelis subcapitata*. *Aquatic Toxicology*, Volume 166, Pages 29-35 (2015).
- Rempel, A., Nadal Biolchi, G., Farezin Antunes, A.C. et al.** Cultivation of Microalgae in Media Added of Emergent Pollutants and Effect on Growth, Chemical Composition, and Use of Biomass to Enzymatic Hydrolysis. *Bioenerg. Res.* **14**, 265–277 (2021).
- Sendra, M., Rodriguez-Romero, A., Yeste, M. P., Blasco, J., & Tovar-Sánchez, A.** Products released from surgical face masks can provoke cytotoxicity in the marine diatom *Phaeodactylum tricornutum*. *Science of The Total Environment*, 156611, (2022).
- Suzuki, S., Yamaguchi, H., Nakajima, N. et al.** *Raphidocelis subcapitata* (= *Pseudokirchneriella subcapitata*) provides an insight into genome evolution and environmental adaptations in the Sphaeropleales. *Sci Rep* **8**, 8058 (2018).
- T. Debenest, A.N. Petit, F. Gagné, M. Kohli, N. Nguyen, C. Blaise.** Comparative toxicity of a brominated flame retardant (tetrabromobisphenol A) on microalgae with single and multi-species bioassays *Chemosphere*, 85, pp. 50-55. (2011).
- Van Wezel A. P. & van Vlaardingen P.** Environmental risk limits for antifouling substances. *Aquatic Toxicology*, 66: 427-444, (2004).
- Wenfeng Yang, Xinxin Gao, Yixiao Wu, Liang Wan, Lichen Tan, Shaoman Yuan, Huijun Ding, Weihao Zhang.** The combined toxicity influence of microplastics and nonylphenol on microalgae *Chlorella pyrenoidosa*. *Ecotoxicology and Environmental Safety*. Volume 195, (2020).

