

UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES
FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES
DEPARTAMENTO DE BIODIVERSIDAD Y BIOLOGÍA
EXPERIMENTAL



**Evaluación toxicológica de los antiinflamatorios
ibuprofeno y diclofenac y sus mezclas en el
crecimiento de tres cepas de algas verdes.**

Mariana Takara

Directora: Dra. Anahí Magdaleno

Facultad de Farmacia y Bioquímica.
Departamento de Sanidad, Nutrición, Bromatología y Toxicología.
Cátedra de Salud Pública e Higiene Ambiental.

-AÑO 2022-

Este trabajo se llevó a cabo con el financiamiento provisto por el proyecto UBACyT N° 20020170100359BA, cuyo título es "Evaluación del impacto de la contaminación en áreas urbanas y agrícola-ganaderas de Buenos Aires".

Directora de Tesis: Anahí Magdaleno, Lugar de realización: Departamento de Sanidad, Nutrición, Bromatología y Toxicología, Cátedra Salud Pública e Higiene Ambiental, Universidad de Farmacia y Bioquímica, UBA

Los resultados preliminares del presente trabajo fueron presentados en la Asociación Toxicológica Argentina:

“Evaluación toxicológica de los antiinflamatorios ibuprofeno y diclofenac y sus mezclas en el crecimiento de tres cepas de algas verdes”

Takara, M., Magdaleno, A. Juárez, A. B.

XXXIX Jornada Interdisciplinarias de Toxicología.
II Encuentro Latinoamericano de Residentes.
III Jornada Iberoamericanas de Toxicología.
NUESTRO PLANETA, NUESTRA SALUD: APORTES DESDE LA
TOXICOLOGIA

SEDE: Auditoria de OSDE. Leandro N. Alem 1067 2do Subsuelo- CABA.

MODALIDAD HIBRIDA

Índice

Agradecimientos	5
Resumen	6
Abstrat	7
Glosario	8
Introducción general	9
Contaminantes emergentes: los productos farmacéuticos	11
Problemáticas por fármacos: Diclofenac e Ibuprofeno	13
Estudios ecotoxicológicos sobre diclofenac e ibuprofeno	16
Bioensayos ecotoxicológicos	17
Bioensayos con algas	18
Evaluación ecotoxicológica de mezclas de contaminantes	19
Análisis de riesgo ambiental	21
Objetivo general	22
Hipótesis	23
Materiales y métodos	
Sustancias químicas	24
Análisis HPLC-UV	24
Mantenimiento y cultivos de las algas	25
Bioensayos de toxicidad	26
Análisis de datos	28
Mezclas Binarias	29
Estimación de riesgo	30
Resultados	
Curvas de calibración Densidad Celular vs Absorbancia	32
Toxicidad del diclofenac y del ibuprofeno	34
Ensayos de toxicidad con los fármacos en mezclas	38
Análisis de Riesgo Ambiental	42
Discusión	44
Conclusiones	51
Bibliografía	52
Anexo	58

AGRADECIMIENTOS.

En primer lugar quiero agradecer a mi Directora Dra. Anahí Magdaleno por darme la oportunidad de poder realizar esta tesina de licenciatura. Por la dedicación y mucha paciencia en todo momento. Estoy muy agradecida por darme esta oportunidad.

A la Cátedra de Salud Pública e Higiene Ambiental de la Facultad de Farmacia y Bioquímica, UBA por abrirme las puertas de su laboratorio y permitirme trabajar en la tesina. A la Facultad de Ciencias Exactas y Naturales por todos estos años de formación y a los profesores, los cuales me contagiaron el entusiasmo y el amor por la biología.

A las Dras. Manuela Martinefski, Valeria Tripodi y Silvia Lucamgioli, de la Cátedra de Tecnología Farmacéutica de la Facultad de Farmacia y Bioquímica, UBA, que hicieron posible la determinación de los fármacos con los cuales realicé el proyecto de Tesis.

A todos mis Compañeros/as y Amigos/as que la vida me cruzó en Exactas; gracias, sin ellos, los días de cursada hubiesen sido eternos. Gracias por el apoyo, la compañía y el aguante.

A Lucia, Alejandra y Adara, amigas que la facultad me dio. Con las cuales pasé momentos muy lindos fuera del ámbito académico. Gracias por el aguante!

A Mariana, Sofía y Mariano, amigos que la facultad me dio. Compañeros de mateadas, aventuras, risas constantes y, como no, remadas de momentos difíciles.

A Mariana, gracias por ayudarme en todo mis proyectos y por ser parte de mi vida y mis decisiones.

A Claudia Dos Reis, por llevarme y traerme de la facultad, por esperarme cuando me retrasaba y por las lindas charlas y anécdotas que tuvimos, las cuales me servían para despejarme después de un largo día de cursada.

A mis terapistas, por ayudarme a ser la mejor versión de mí; siempre en positivo y para adelante.

A toda esa gente linda que paso por mi vida, gracias.

A Mis Amigas del alma, si les digo “gracias”, me quedo corta; no hay palabra que pueda englobar lo agradecida de tenerlas siempre conmigo; por el apoyo y las risas. Por estar siempre en las buenas y en las malas.

A Mi Familia, pilar muy importante en mi vida. Siempre juntos. Somos Nosotros.

A Mi Hermana, a Mi Cuñi y a mi futuro Sobri, agradezco de tenerlos siempre a mi lado. Gracias por el apoyo y empuje incondicional.

Y Mi Mamá y a Mi Papá, por darme todo lo que tengo, por estar siempre a mi lado, por alentarme a seguir adelante, sin Uds. no estaría escribiendo esta tesis. Por eso y por mucho más, se los dedico a ellos.

“Y nunca te rindas, los sueños si se cumplen”

RESUMEN

La presencia de contaminantes emergentes en el ambiente acuático ha cobrado gran interés durante las últimas décadas. En particular, los productos farmacéuticos llegan a los ríos y arroyos a través de las descargas de aguas residuales domésticas. Estos compuestos pueden ejercer varios efectos perjudiciales sobre los organismos vivos en los ecosistemas acuáticos. Debido al amplio uso de antiinflamatorios no esteroideos, tales como el y el diclofenac (DFN) e ibuprofeno (IBU), se planteó como objetivo en la presente tesis evaluar la toxicidad de estos fármacos sobre las algas fotosintéticas, tanto en forma individual como en sus mezclas. Para ello se utilizaron tres cepas de algas verdes, la cepa estándar *Raphidocelis subcapitata* y dos cepas autóctonas, *Ankistrodesmus fusiformis* y *Scenedesmus acutus*. Los bioensayos se realizaron por duplicado en condiciones controladas utilizándose 5 concentraciones crecientes de IBU y DFN (entre 10 y 150 mg/L), y un control sin fármaco. El crecimiento de las algas se midió por turbidez a las 72 horas, mediante lecturas de absorbancia a 750 nm. Los valores de inhibición del crecimiento con respecto al control en función de la concentración se ajustaron a una curva sigmoidea. A partir de cada curva se estimaron las CE_{20} , CE_{50} y CE_{80} . Estas concentraciones se utilizaron para realizar los bioensayos con las mezclas de ambos fármacos en cada cepa. A partir de estas concentraciones inhibitorias y las concentraciones ambientales, se calculó el cociente de riesgo (RQ). Según las CE_{50} obtenidas, la cepa más sensible fue la especie estándar *R. subcapitata* y la más resistente fue *S. acutus*, mientras que la cepa de *A. fusiformis* mostró una sensibilidad intermedia. Las CE_{50} para el IBU en las tres cepas fueron de 20.05, 53.19 y 26.67 mg/L, respectivamente, y para el DFN fueron de 8.03, 85.81 y 14.57 mg/L, respectivamente. De este modo, el DFN resultó más tóxico para las cepas *R. subcapitata* y *A. fusiformis*, mientras que el IBU resultó más tóxico para *S. acutus*. Las mezclas mostraron un efecto sinérgico en *R. subcapitata*, un efecto aditivo en *A. fusiformis* y un efecto antagónico en *S. actus*. Según los valores de RQ, tanto para los fármacos individuales como para las mezclas, las concentraciones ambientales no ejercerían un riesgo para el crecimiento de las algas. En conclusión, las distintas respuestas de las algas al IBU y DFN y a sus mezclas muestran la importancia de utilizar cepas de diferentes especies, especialmente cepas autóctonas.

Palabras clave: *Raphidocelis subcapitata*, *Ankistrodesmus fusiformis*, *Scenedesmus acutus*, Diclofenac, Ibuprofeno, Toxicidad.

ABSTRACT

The presence of emerging pollutants in the aquatic environment has gained great interest during the last decades. In particular, pharmaceuticals reach rivers and streams through domestic wastewater discharges. These compounds can exert various detrimental effects on living organisms in aquatic ecosystems. Due to the wide use of non-steroidal anti-inflammatory drugs, such as ibuprofen (IBU) and diclofenac (DFN), the objective of this thesis was to evaluate the toxicity of these drugs on photosynthetic algae, both individually and in their mixtures. For this, three strains of green algae were used, the standard strain *Raphidocelis subcapitata* and two native strains, *Ankistrodesmus fusiformis* and *Scenedesmus acutus*. Bioassays were performed in duplicate under controlled conditions using five increasing concentrations of IBU and DFN (between 10 and 150 mg/L) and a control without drug. The growth of the algae was measured by turbidity during 72 hours and by absorbance readings at 750 nm. Growth inhibition values relative to control as a function of concentration were fitted to a sigmoid curve. The EC₂₀, EC₅₀, and EC₈₀ were estimated from each curve. These concentrations were used to carry out the bioassays with the mixtures of both drugs in each strain. From these inhibitory concentrations and the environmental concentrations, the risk quotient (RQ) was calculated. According to the EC₅₀ obtained, the most sensitive strain was the species *R. subcapitata* and the most resistant was *S. acutus*, while the *A. fusiformis* strain showed intermediate sensitivity. The EC₅₀ for the IBU in the three strains were 20.05, 53.19 and 26.67 mg/L, respectively, and for the DFN were 8.03, 85.81, and 14.57 mg/L, respectively. Thus, DFN was more toxic for *R. subcapitata* and *A. fusiformis* strains, while IBU was more toxic for *S. acutus*. The mixtures showed a synergistic effect on *R. subcapitata*, an additive effect on *A. fusiformis*, and an antagonistic effect on *S. actus*. Based on the RQ values for both individual drugs and mixtures, ambient concentrations would not exert a risk to algae growth. In conclusion, the different responses of the algae to IBU and DFN and their mixtures show the importance of using strains of different species, especially native strains.

Key words: *Raphidocelis subcapitata*, *Ankistrodesmus fusiformis*, *Scenedesmus acutus*, Diclofenac, Ibuprofen, Toxicity.

GLOSARIO

Bioacumulación/Bioconcentración: es el proceso de acumulación de sustancias químicas en organismos vivos de forma que estos alcanzan concentraciones más elevadas que las concentraciones en su medio.

Bioensayo: empleo de sistema biológico, de variados niveles de complejidad, para establecer el impacto de sustancias tóxicas sobre los organismos vivos.

Biodegradable: cuando puede descomponerse en los elementos químicos que lo conforman, debido a la acción de agentes biológicos y condiciones ambientales de distinto tipo.

Biomagnificación: aumento en la concentración de un contaminante en los tejidos de organismos en sucesivos niveles de la red trófica.

CE50 (concentración efectiva 50): concentración de toxico que causa un efecto subletal del 50% de la población expuesta (una disminución de crecimiento poblacional, de fecundidad, de actividad enzimática, etc.).

Ecotoxicología: es una disciplina científica que combina la ecología con la toxicología.

Eutrofización: es un proceso natural que puede ser acelerado por el ingreso de nitrógeno y fosfato por parte de las actividades humanas

Fotooxidación: Modificación de las propiedades físico-químicas de una sustancia por la acción del oxígeno y de la luz solar.

Nivel trófico: Son cada uno de los conjuntos de organismos de un ecosistema que obtienen la materia y la energía de la misma forma, por lo que ocupan un lugar equivalente en la cadena alimenticia. La energía que necesitan los seres vivos para realizar las funciones vitales (nutrición, relación y reproducción) proviene del Sol. Los productores, que están representados por las plantas, algas y ciertas bacterias se encargan, mediante la fotosíntesis, de transformar la materia inorgánica en orgánica. Esta materia y energía pasará al resto de organismos del ecosistema, como los consumidores primarios o herbívoros (se alimentan directamente de los productores) y consumidores secundarios o carnívoros (se alimentan de los consumidores primarios). Por último, los organismos descomponedores serán los encargados de descomponer esta materia orgánica en inorgánica, cerrando el ciclo para que se pueda volver a iniciar.

INTRODUCCIÓN GENERAL

En los ecosistemas naturales, los seres vivos interactúan con el medio físico en una permanente transformación de materia y energía, donde ocurren cambios a lo largo de una sucesión hacia un estado de mayor organización y complejidad. Sin embargo, la interacción del hombre con su entorno mediante la sobreexplotación de los recursos y la producción de residuos sólidos y líquidos, que son liberados y acumulados en zonas diferentes a las de su origen donde los procesos de biodegradación son insuficientes, puede considerarse como una grave alteración de los equilibrios naturales de los ecosistemas.

El ecosistema acuático es uno de los más importantes en el planeta por su extensión; está conformado por humedales, pantanos, esteros, lagunas, lagos, arroyos, ríos, mares y océanos. Durante muchos años se consideró erróneamente que las aguas poseían un elevado poder de dilución y una rápida y segura biodegradabilidad de las sustancias exógenas. Sin embargo, muchas de estas sustancias pueden exigir una tasa de dilución de diez y hasta cien veces, o bien pueden no ser biodegradadas o tener tiempos largos de degradación y, al mismo tiempo, tener un efecto acumulativo en los organismos (World Resources, 1996).

Existe una gran cantidad de sustancias producidas por el hombre que contaminan y afectan a los ecosistemas. Éstas incluyen sustancias de uso doméstico, detergentes, cosméticos, fármacos, tinturas, plaguicidas, solventes, compuestos intermediarios de procesos industriales, aditivos, productos utilizados para el tratamiento de efluentes, entre otros (Jørgensen et al., 1998). Asimismo, en las últimas décadas, la producción mundial de estas sustancias aumentó a más de 400 millones de toneladas (Di Marzio y Sáenz, 2013). Muchos de estos

contaminantes pueden estar presentes simultáneamente en un cuerpo de agua y formar mezclas, cuyos efectos sobre los organismos acuáticos son, con frecuencia, desconocidos (Broderius et al., 2005). Del mismo modo, resulta difícil evaluar y predecir los peligros y riesgos asociados a la presencia de la mezcla de contaminantes en el medio ambiente.

Según Moriarty (1984), un contaminante es todo aquel agente natural o artificial derivado de la actividad humana que causa modificaciones en el equilibrio ecológico, pudiendo tener o no toxicidad intrínseca, entendiendo por toxicidad a la capacidad de una sustancia o material de producir un efecto adverso en un organismo o en una población. Asimismo, muchos contaminantes pueden presentar alta persistencia y acumularse en los tejidos, mediante procesos de bioconcentración y bioacumulación, o pueden transferirse a través de los niveles tróficos mediante procesos de biomagnificación. El grado en que estos procesos ocurran dependerá del origen, concentración y propiedades fisicoquímicas de las sustancias contaminantes y de las características de los ecosistemas. Por otra parte, estas sustancias pueden ser transportadas y transformadas en el ambiente a través de procesos fisicoquímicos de adsorción y desorción a partículas, sedimentación, fotooxidación, reacciones de reducción y oxidación, y formación de complejos químicos. Estos mecanismos de transformación pueden dar origen a otros compuestos o sustancias que posean menor, similar o mayor toxicidad, lo que influye sobre su biodisponibilidad y su actividad biológica (Menzer, 1991).

Los contaminantes pueden llegar a las aguas superficiales a través de fuentes puntuales como los desagües industriales y cloacales, localizados en las áreas urbanas, o a través de fuentes difusas como las aguas de escorrentía de campos cultivados en las áreas agropecuarias. En particular, los cloacales contienen un

elevado contenido de materia orgánica, microorganismos patógenos y residuos de una amplia variedad de fármacos de uso humano, entre otros.

CONTAMINANTES EMERGENTES: LOS PRODUCTOS FARMACÉUTICOS

Con el desarrollo de técnicas analíticas sensibles, se pudieron identificar nuevos compuestos químicos potencialmente nocivos para los seres vivos en el ambiente (Bolong et al., 2009). Estos nuevos compuestos se definen como *contaminantes emergentes*, es decir, compuestos químicos (ya sea de origen natural o sintético) que no son monitoreados comúnmente en el ambiente, pero que poseen la potencialidad de ingresar y causar efectos adversos en el ecosistema o en la salud humana. Como ejemplo se pueden mencionar los compuestos farmacéuticos, los productos para la higiene personal, las sustancias surfactantes, los aditivos industriales, etc. Si bien estos contaminantes han sido liberados al ambiente desde hace tiempo, su detección pudo ser posible a partir del desarrollo de nuevos y mejores métodos de análisis. Asimismo, la síntesis de nuevas sustancias, así como cambios en el uso y descarte de las ya existentes, se consideran nuevas fuentes de contaminación emergente (Bolong et al., 2009; Ziyilan y Ince, 2011).

Los productos farmacéuticos consisten en un gran conjunto de sustancias que pertenecen a distintos grupos químicos. Como resultado del uso en medicina humana y veterinaria, estos compuestos son introducidos constantemente en el ambiente, y por esta razón han sido reconocidos como contaminantes ambientales de relevancia (Kümmerer, 2009). Están diseñados para producir efectos biológicos y terapéuticos a través de su interacción con vías específicas en el cuerpo humano y animales, y suelen ser activos en concentraciones muy bajas. En los ecosistemas, la interacción de estos productos con los organismos considerados “no blanco” podría

causar efectos biológicos adversos (Henschel et al., 1997). Se han encontrado bajas concentraciones de antibióticos en aguas subterráneas (del orden de ng/L) y en aguas superficiales (del orden de µg/L) (Kümmerer, 2009). A pesar de que varios fármacos pudieron ser detectados en muy baja concentración, su constante liberación al ambiente debido al uso ininterrumpido, puede llevar a una exposición crónica sobre organismos “no blanco”. En consecuencia, estos compuestos son considerados contaminantes pseudopersistentes, ya que las tasas de introducción en el ambiente superan a las tasas de degradación (Huerta et al., 2013). Por otra parte, los fármacos pueden estar presentes en el agua potable y acumularse en la cadena alimentaria, y así en los alimentos consumidos por el hombre. De este modo, resultan ser sustancias potencialmente peligrosas y, por lo tanto, una amenaza para la salud humana. Por todas estas características, la Agencia de Protección Ambiental de los Estados Unidos de Norteamérica (EPA) considera a los fármacos como contaminantes de preocupación emergente (USEPA, 2008 a,b).

La principal vía de emisión de los productos farmacéuticos en las aguas superficiales es a través de la descarga continua de los efluentes de las plantas de tratamiento de las aguas cloacales (Amariei et al., 2017). En Argentina, sin embargo, este tipo de tratamiento es escaso y las descargas de aguas residuales urbanas prácticamente no tienen tratamiento. De este modo, en dichas aguas y en las aguas superficiales pueden encontrarse simultáneamente varias sustancias activas, sus metabolitos y/o sus productos de degradación (Santos et al., 2010).

PROBLEMÁTICAS POR FÁRMACOS: IBUPROFENO Y DICLOFENAC

Una característica general de los productos farmacéuticos es que no se metabolizan totalmente en el organismo, por lo que en muchos casos más del 70% es liberado al ambiente como compuesto inalterado a través de las heces y la orina (Jjemba, 2006). Por otra parte, las tecnologías de tratamiento de aguas residuales conocidas hasta el momento resultan poco efectivas para eliminar la mayoría de los compuestos biológicamente activos (Santos et al., 2010). Así, estos compuestos pueden estar en contacto con los diferentes organismos del ecosistema (Jones et al., 2005).

Debido a que la presencia de fármacos en el ambiente es de reciente hallazgo, todavía existe poca información acerca de los mecanismos de toxicidad y, por lo tanto, de estándares de concentración aceptables para la biota (USEPA, 2008 a,b). En Europa existen aproximadamente 4000 compuestos químicos activos que se utilizan actualmente para curar y cuidar la salud humana y animal (Szymonik y Lach, 2012). De este modo, la gran variedad de estructuras químicas que deberían ser monitoreadas en el ambiente, como así también sus diversas influencias sobre los organismos vivos, resulta una tarea complicada. Entre toda la variedad de compuestos químicos se destacan los antibióticos, los medicamentos que regulan el metabolismo de los lípidos, los agentes hormonales, los fármacos antiepilépticos y los antiinflamatorios no esteroideos.

Los antiinflamatorios no esteroideos, conocidos como AINEs, tales como el diclofenac (DFN) y el ibuprofeno (IBU), se encuentran entre los fármacos más utilizados principalmente debido a la automedicación (Li, 2014). La mayoría de los AINEs contienen grupos funcionales muy resistentes al metabolismo (por ejemplo,

grupos aromáticos, -F, -Cl, -CF₃, etc.), lo que aumenta su vida media en el cuerpo humano y prolonga el tiempo de degradación en el ambiente. De este modo, son moléculas estables y pueden ser persistentes en los cuerpos de agua naturales por períodos de tiempo de entre días a meses (Benotti y Brownawell, 2009; Yamamoto et al., 2009). Además, el DFN inhibe el desarrollo normal de la flora bacteriana en las plantas de tratamiento de aguas residuales (Ziylan y Ince, 2011), con lo que el proceso de biodegradación resulta más lento.

El diclofenac (ácido 2-[2-[(2,6-diclorofenil) amino] fenil] acético) es un ácido débil (Figura 1), cuyo mecanismo de acción consiste en evitar la síntesis de prostaglandinas mediante la inhibición de una o ambas isoformas de la enzima ciclooxigenasa (COX-1 y COX-2), reduciendo de esta forma los procesos de inflamación que generan dolor (Bacsi et al., 2016). El DFN se utiliza, de este modo, como antipirético, analgésico y antiinflamatorio.

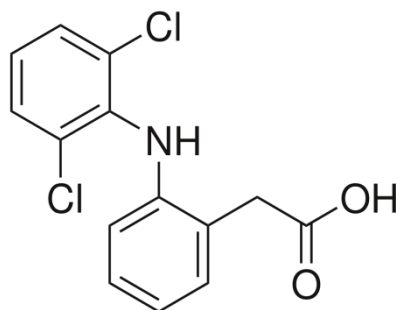


Figura 1: Estructura molecular del ácido 2-[2-[(2,6-diclorofenil) amino] fenil] acético

El ibuprofeno ((RS) -2- (4- (2-metilpropil) fenil) propanoico) es un ácido débil (Figura 2), que presenta propiedades antiinflamatorias, antipiréticas y analgésicas. Se desconoce el modo exacto de acción de este fármaco, pero se sabe que actúa como un inhibidor de la síntesis de prostaglandinas a nivel periférico. Se lo utiliza para el alivio sintomático de la fiebre, cefaleas, odontalgias, dolor muscular, dolores

menstruales, dolor neurológico de carácter leve o moderado y dolor postquirúrgico. También se usa para tratar cuadros inflamatorios, como los que se presentan en artritis y artritis reumatoide. En ocasiones se lo utiliza para tratar el acné debido a sus propiedades antiinflamatorias (Cleuvers, 2004).

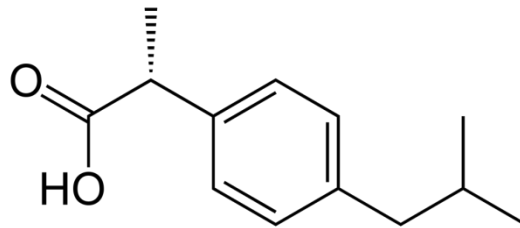


Figura 2: Estructura molecular del ácido (RS)-2-(4-isobutilfenil) propanoico

Una vez eliminados del organismo a través de las excretas, estos fármacos pasan a la red cloacal, la cual recibe un tratamiento primario, secundario y en algunos casos terciarios, los cuales consisten en una combinación de procesos físicos, químicos y biológicos. La eficacia de eliminación de los AINEs luego de este tratamiento varía dentro de un amplio rango y depende de la estructura química de la molécula del fármaco. El IBU puede ser eliminado con una eficiencia de entre el 74% y el 100% durante el tratamiento de estas aguas residuales, según Stumpf et al. (1999), Thomas y Foster (2004) y Feng et al. (2013), mientras que el DFN, con una menor eficiencia de eliminación, lo hace entre un 17% y 35%, según Heberer (2002), Quintana et al. (2005) y Feng et al. (2013). En varios países se detectaron concentraciones de DFN e IBU del orden de $\mu\text{g/L}$ en aguas residuales tratadas. Por ejemplo, en el Reino Unido se encontraron concentraciones de $0,424 \mu\text{g/L}$ de DFN y $3,086 \mu\text{g/L}$ de IBU (Ashton et al., 2004), en Alemania concentraciones de DFN de $0,81 \mu\text{g/L}$ y de IBU de $0,37 \mu\text{g/L}$ (Ternes, 1998), en México, entre $0,7$ y $1,4 \mu\text{g/L}$ de

IBU (Gibson et al., 2010), y en Noruega, concentraciones de hasta 0,1 µg/L de IBU (Weigel et al., 2004). En Argentina se han detectado concentraciones de DFN e IBU en aguas residuales de 1,2 µg/L y 13,0 µg/L, respectivamente (Elorriaga et al., 2013 a)

En cuanto a las concentraciones de estos fármacos en aguas superficiales a nivel mundial, en el río Danubio (Hungría) se detectaron entre 1,47 y 3,28 µg/L de DFN y entre 1,53 y 2,87 µg/L de IBU (Helenkar et al., 2010). Por otra parte, en el río Llobregat (España), se encontraron concentraciones de IBU de hasta 9,89 µg/L (Ginebrada et al., 2010), mientras que en el delta del río Pearl (al sur de China) se encontraron 0,68 µg/L de IBU (Zhao et al., 2010). En Alemania, Malasia y en Europa del Este se encontraron concentraciones de 0,16, 0,12 y 4,20 µg/L de DFN, respectivamente (Aus der Beek et al., 2015). En Argentina, sin embargo, existe muy poca información acerca de las concentraciones de estos compuestos en aguas superficiales. Elorriaga et al. (2013b) determinaron concentraciones máximas de DFN (0,50 µg/L) e IBU (9,66 µg/L) en ríos y arroyos de la Provincia de Buenos Aires.

ESTUDIOS ECOTOXICOLÓGICOS SOBRE DICLOFENAC E IBUPROFENO.

Estudios previos mostraron los efectos que el DFN y el IBU ejercen sobre los organismos “no blanco” en los ecosistemas acuáticos. Por ejemplo, Cleuvers (2003, 2004) observó efectos tóxicos al exponer organismos de diferentes niveles tróficos a varias concentraciones de estos fármacos. En el alga verde *Desmodesmus subspicatus* se produjo inhibición del crecimiento en concentraciones de entre 71,9 y 72 mg/L para el DNF y de entre 315 y 342,2 mg/L para el IBU. En la lenteja de agua *Lemna minor* se obtuvo una CE₅₀ para DFN e IBU de 7,5 mg/L y 24,2 mg/L,

respectivamente y en el microcrustáceo *Daphnia magna* se obtuvo una CE_{50} de 68 mg/L y 174 mg/L para esos fármacos, respectivamente. Por otro lado, en el pez cebra (*Danio rerio*) se obtuvo una dosis letal cincuenta (DL_{50}) de 5,3 mg/L luego de las 72 horas de exposición a distintas concentraciones de DNF (Van den Brandhof y Montforts, 2010).

BIOENSAYOS ECOTOXICOLÓGICOS

Los bioensayos de laboratorio son una herramienta útil para conocer la biodisponibilidad y los posibles efectos tóxicos de las sustancias sobre los organismos vivos (Nowell et al., 2014) y poder estimar el riesgo ambiental (Von der Ohe et al., 2011). Los bioensayos de toxicidad monoespecíficos utilizan organismos aislados del ambiente y consisten en mantener dichos organismos bajo condiciones controladas y a diferentes concentraciones de un tóxico para medir a un tiempo final un parámetro determinado. Este tipo de ensayos tienen varias ventajas para su desarrollo (Stauber, 1995; Geis et al., 2000):

- Los métodos son estandarizados,
- Los organismos seleccionados presentan una sensibilidad comprobada a la mayoría de los tóxicos, por lo que pueden responder a concentraciones muy bajas,
- Son técnicas sencillas,
- Son ensayos de corta duración,
- Son de fácil realización y repetición de los resultados,
- Pueden crecer en recipientes pequeños, con lo que se requiere poco espacio para la realización del bioensayo, pudiéndose utilizar varias réplicas,

- Sus resultados pueden ser comparados en el tiempo y con otros laboratorios, los que se expresan como CL₅₀ (concentración letal cincuenta), CE₅₀ (concentración efectiva cincuenta), NOEC (concentración que no causa un efecto observable) y LOEC (mínima concentración que causa un efecto observable),
- Permiten evaluar la calidad del ambiente,
- Presentan bajo costo de realización.

BIOENSAYOS CON ALGAS

Las *algas fotosintéticas* son seleccionadas para llevar a cabo estos bioensayos, ya que están entre los primeros eslabones de la cadena trófica, al igual que las bacterias y, por lo tanto, cumplen un rol crucial en el sostenimiento de los ecosistemas acuáticos y contribuyen a la producción de oxígeno. Estos organismos también muestran una alta sensibilidad a distintos compuestos, siendo utilizados como modelos biológicos para la evaluación de la toxicidad de contaminantes *in vivo* (OECD, 2006). Las algas fotosintéticas en particular son modelos seleccionados en ensayos ecotoxicológicos debido a que tienen crecimiento rápido y pueden cultivarse en el laboratorio utilizando medios sintéticos que permiten mantenerlas en condiciones fisiológicas óptimas. Los factores que influyen en el crecimiento poblacional de las algas en cultivos y que generalmente deben controlarse son: intensidad de luz, el fotoperíodo, la temperatura, el medio nutritivo, el pH, el tamaño del inóculo, el tamaño del recipiente y el volumen de medio nutritivo.

La especie estándar propuesta como organismo de referencia por varias agencias ambientales es el alga verde *Selenastrum capricornutum* (USEPA, 2002; Environmental Canada, 2007; ISO, 2009). Actualmente, la identidad taxonómica

válida para esta especie es *Raphidocelis subcapitata*, según la investigación genómica realizada por Suzuki et al. (2018). Esta especie es sensible a numerosos agentes tóxicos, como metales pesados y pesticidas (Blinova, 2004; Guéguen et al., 2004; Kahru et al., 2005; Magdaleno et al., 2015). Este organismo unicelular con forma de medialuna con medidas aproximadas de 4,8-1,8 x 1,6-4,4 μm , (Castillo Morales, 2004), se encuentra ampliamente distribuido en aguas eutróficas y oligotróficas (Komárek y Marvan, 1979). Sin embargo, los efectos de los contaminantes sobre una especie estándar no necesariamente son los mismos que los que ocurren en cepas de especies aisladas de cuerpos de agua de una zona de interés. Las cepas autóctonas pueden proporcionar información relevante que permita inferir los efectos de los contaminantes en su medio ambiente (Magdaleno et al., 2014; Carusso et al., 2018).

EVALUACIÓN ECOTOXICOLÓGICA DE MEZCLAS DE CONTAMINANTES

Los organismos vivos se encuentran expuestos simultáneamente a una mezcla compleja de compuestos en los ambientes naturales. Así como fuera descrito por Elorriaga et al. (2013b), varios compuestos farmacéuticos fueron detectados en aguas superficiales de ríos y arroyos de la Provincia de Buenos Aires, tales como Atenolol, Carbamazepina, IBU y DFN. De este modo, la inclusión del análisis de los efectos de las mezclas de dos o más de este tipo de contaminantes sobre los organismos vivos resulta necesaria para una interpretación más precisa de los posibles riesgos ambientales a los que se encuentran expuestos dichos organismos (Broderius et al., 2005).

Los efectos de las mezclas de contaminantes sobre organismos “no blanco” resultan difíciles de predecir. Una aproximación puede realizarse mediante ensayos

de laboratorio utilizando mezclas de dos contaminantes (Khetan y Collins, 2007; Carusso et al., 2018; Afione Di Cristofano et al., 2021). De este modo, las mezclas binarias, por ejemplo, pueden interactuar de manera aditiva, antagónica o sinérgica, es decir, la toxicidad de la mezcla puede resultar igual, menor o mayor que los efectos de sus componentes individuales, respectivamente (Backhaus et al., 2000, 2008; Broderius et al., 2005).

Para tener una aproximación más real de los posibles efectos de las mezclas binarias sobre los organismos de ensayo, se han desarrollado modelos basados en el desarrollo de una relación cuantitativa entre los efectos de las mezclas y los efectos tóxicos individuales. Usualmente se utilizan dos métodos predictivos: el modelo de Concentración Aditiva (CA), que asume que los dos compuestos ejercen el mismo efecto tóxico, y el modelo de Acción Independiente (AI), que supone que los dos compuestos en la mezcla actúan de forma diferente (Vasquez et al., 2014). En este último caso, el efecto de uno de los tóxicos en una mezcla permanece sin cambios en presencia de otro compuesto (Cleavers, 2003, 2004). Estos dos modelos predicen la toxicidad de una mezcla en función de las toxicidades individuales de sus componentes (Altenburger et al., 2004).

El uso de estos modelos provee una manera de entender el comportamiento de las mezclas binarias. Si bien funcionan como un punto de referencia para los efectos aditivos, pueden ocurrir desviaciones de los modelos que indican otras interacciones, como sinergismo o antagonismo. Cleavers (2003, 2004) demostró efectos aditivos al exponer especie de alga verde (*Desmodesmus subspicatus*) a mezclas binarias de DFN e IBU, y efectos sinérgicos en el microcrustáceo *Daphnia magna*. Por otra parte, Carusso et al. (2018) demostró efectos aditivos, antagónicos

y sinérgicos en mezclas binarias de los antibióticos clortetraciclina, oxitetraciclina y enrofloxacin en dos especies de algas verdes (*R. subcapitata* y *A. fusiformis*).

ANÁLISIS DE RIESGO AMBIENTAL

Las concentraciones ambientales y los datos ecotoxicológicos simultáneamente permiten obtener información acerca del riesgo ambiental por la presencia de esos contaminantes en los ecosistemas. De este modo, el riesgo al que se encuentra sometida una determinada especie (por ejemplo, la inhibición de su crecimiento) por la presencia de una sustancia puede determinarse a partir de la concentración de esa sustancia por debajo de la cual no se espera que ocurra un efecto adverso. Esta concentración de no efecto se conoce como NOEC y se aplica en el cociente de riesgo (RQ) como concentración prevista de no efecto (PNEC). De este modo, el RQ se calcula como la concentración ambiental de una sustancia tóxica (MEC) dividido la PNEC. La obtención de la PNEC depende de los datos disponibles en la literatura, que suelen ser las concentraciones efectivas 50 (CE_{50}) en ensayos a corto plazo. A partir de estos valores de CE_{50} se debe aplicar un factor de seguridad igual a 1000 ($CE_{50}/1000$) que se considera como un valor equivalente a la PNEC (OECD, 2008). El valor de RQ puede ser igual, menor o mayor que 1, lo que significa que esos organismos no se encuentran afectados por la presencia del contaminante en cuestión, o que efectivamente están afectados por los niveles del contaminante en el ambiente, respectivamente. A partir de la información proporcionada por el RQ para los contaminantes de interés, por ejemplo, IBU y DFN, podría predecirse el riesgo de inhibición del crecimiento al que se encuentran expuestas las poblaciones de algas dentro del ecosistema.

OBJETIVO GENERAL

El objetivo general del presente trabajo fue evaluar la toxicidad de dos antiinflamatorios no esteroideos, el ibuprofeno y el diclofenac, sobre tres cepas de algas verdes, tanto en forma individual como en sus mezclas. Estos dos compuestos farmacéuticos de uso humano son ampliamente utilizados y se los ha detectado en aguas residuales y aguas superficiales de Argentina. El objetivo general se cumplió desarrollando los siguientes objetivos específicos:

1. Evaluar la toxicidad (inhibición del crecimiento) del ibuprofeno y del diclofenac sobre la especie de alga estándar *Raphidocelis subcapitata* y sobre dos cepas de algas verdes autóctonas: *Ankistrodesmus fusiformis*, aislada del río Matanza-Riachuelo, y *Scenedesmus acutus*, aislada del arroyo Burgos, afluente del río Arrecifes, Provincia de Buenos Aires.
2. Evaluar la toxicidad de las mezclas de ambos compuestos en las concentraciones inhibitorias 20, 50 y 80, obtenidas individualmente sobre las tres cepas de algas, y comparar los resultados experimentales con el modelo de aditividad.
3. Establecer la sensibilidad de las tres cepas a partir de los resultados de CE_{20} , CE_{50} y CE_{80} .
4. Realizar un análisis del riesgo de inhibición del crecimiento de las algas a partir de la utilización del cociente de riesgo (RQ).

Hipótesis

- Los compuestos farmacéuticos ibuprofeno y diclofenac inhiben el crecimiento de las cepas de algas verdes *R. subcapitata*, *A. fusiformis* y *S. acutus*, a través de la determinación de la CE 20, 50 y 80.
- El ibuprofeno y el diclofenac son más tóxicos para *R. subcapitata*, *A. fusiformis* y *S. acutus* cuando se encuentran en mezclas binarias que cuando actúan de manera individual, a partir de los resultados de CE20, CE50 y CE80.
- La mayor toxicidad de las mezclas se debe a un efecto sinérgico o a un efecto aditivo de los dos compuestos, a partir de las concentraciones efectivas.
- Las cepas autóctonas, aisladas de cuerpos de agua con cierto grado de contaminación, son más tolerantes a los fármacos y sus mezclas que la especie estándar *R. subcapitata*, a partir de los resultados de CE₂₀, CE₅₀ y CE₈₀.
- Las algas, *R. subcapitata*, *A. fusiformis* y *S. acutus* se encuentran en riesgo de inhibir su crecimiento debido a la presencia de ibuprofeno, diclofenac o ambos actuando simultáneamente, a partir de la utilización del cociente de riesgo (RQ).

MATERIALES Y MÉTODOS

1) Sustancias químicas

Se trabajó con los siguientes productos farmacéuticos: ácido 2-[2-[(2,6-diclorofenil) amino] fenil] acético (DFN), N° CAS 15307-79-6 y ácido (RS)-2-(4-isobutilfenil) propanoico (IBU), N° CAS 31121-93-4. Las características y propiedades fisicoquímicas de estos compuestos se muestran en la Tabla I del ANEXO.

Para la realización de los bioensayos se prepararon soluciones concentradas de DFN e IBU (principios activos proporcionados por la Cátedra de Tecnología Farmacéutica, Facultad de Farmacia y Bioquímica) de 1 g/L en agua destilada ultrapura, inmediatamente antes de realizar cada ensayo. El IBU se solubilizó previamente en una solución alcalina de NaOH 0,4% en una relación 1:10. A partir de las soluciones concentradas de DFN e IBU se realizaron sucesivas diluciones en medio mineral para algas hasta obtener seis concentraciones totales para cada ensayo, las cuales fueron de entre 5 hasta 150 mg L⁻¹ dependiendo de la cepa utilizada. Las concentraciones de los fármacos se midieron por cromatografía líquida de alta resolución (HPLC-UV).

2) Análisis HPLC-UV

Concentraciones nominales de 10 y 100 mg/L de DFN e IBU fueron verificadas mediante cromatografía líquida de alta resolución (HPLC), tanto al comienzo como al final de los bioensayos. Volúmenes de 20 µL de cada concentración se introdujeron en la columna de HPLC mediante un inyector

automático (Thermo Scientific Spectra System AS3000, EE. UU.). El DFN y el IBU se cuantificaron en un HPLC Spectra System SCM1000 (Thermo Scientific, Waltham, MA, EE. UU.) provisto de una bomba cuaternaria, un desgasificador P4000, un automuestreador AS3000 y un detector de absorbancia UV2000 Dualλ. La separación de DFN e IBU se logró con una columna Synchronis™ C18 (150 × 4,6 mm, 5 μm de diámetro de partícula, Thermo Scientific). La fase móvil consistió en una mezcla de metanol y agua con ácido fórmico al 0,1% (80:20 v/v). El caudal se fijó en 1,0 ml/min y la temperatura de la columna se fijó en 35 °C. El efluente de la columna se controló a 220 nm. La separación cromatográfica de las muestras de DFN e IBU se logró en menos de 7 min. Los cromatogramas se procesaron usando el software del sistema de datos de cromatografía ChromQuest.

3) Mantenimiento y cultivos de las algas

Se trabajó con especies de algas verdes pertenecientes al Orden Chlorococcales. La especie estandarizada a nivel internacional, *Raphidocelis subcapitata* (Koršhikov), fue obtenida de la Colección de Cultivos de Algas y Protozoos de Inglaterra (CCAP N° 278/4), y las especies *Ankistrodesmus fusiformis* (Corda) y *Scenedesmus acutus* (Meyen) fueron aisladas del Río Matanza-Riachuelo (Magdaleno et al., 2014) y del Arroyo Burgos (Afione de Cristofano et al., 2021), respectivamente. Todas las cepas se encuentran en la Colección de cultivos de algas y ciliados del laboratorio de Biología de Protistas” (Centro de Recursos Genéticos, FCEN-UBA); la cepa *A. fusiformis* como BAFC CA 11 y la cepa *S. acutus* como BAFC CA 14 (Figura 3). Estas algas se mantuvieron en tubos pico de flauta con medio sólido Bold's Basal Medium (BBM) (Archibald y Bold, 1970) en

condiciones axénicas de crecimiento (Tabla II del ANEXO). Para los cultivos líquidos en batch se trabajó con frascos Erlenmeyer de 125 mL conteniendo 25 mL de medio BBM. Estos cultivos se mantuvieron en agitación continua (80 rpm) durante 5 a 7 días, bajo luz continua ($80 \mu\text{mol fotones m}^{-2} \text{s}^{-1}$) y $22 \pm 2 \text{ }^\circ\text{C}$.

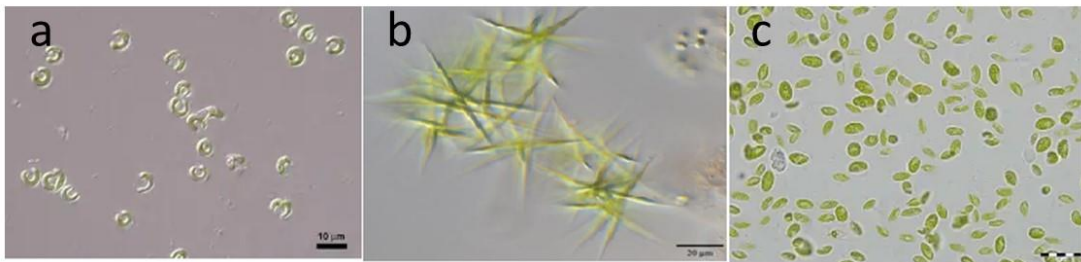


Figura 3: a) *Raphidocelis subcapitata* (Koršhikov); b) *Ankistrodesmus fusiformis* (Corda); c) *Scenedesmus acutus* (Meyen)

4) Bioensayos de toxicidad

El protocolo de ensayo se llevó a cabo siguiendo la normativa establecida por la Agencia de Protección Ambiental de los Estados Unidos (**USEPA, 2002**), el cual se resume en la figura 4. Las condiciones del mismo se detallan en la Tabla III del Anexo. Los inóculos de las algas se obtuvieron a partir de cultivos stock en frascos Erlenmeyer de 125 mL, los que alcanzaron una fase de crecimiento exponencial de aproximadamente 1×10^7 células/mL. Estos cultivos se mantuvieron en las mismas condiciones mencionadas arriba. Se prepararon seis o siete concentraciones de cada fármaco en los ensayos y un control en medio BBM sin fármaco. Se realizaron cinco ensayos como mínimo.

Para estimar la densidad celular del inóculo se realizaron recuentos en cámara de Neubauer hasta obtener un error estimado ($\alpha=0,05$) menor del 10%, según:

$$e (\%) = \frac{S}{\sqrt{n}} * t_{(\alpha, n-1)}$$

X

Donde e (%) es el error porcentual, S el desvío estándar, n el número de campos, X es la media muestral y t (α , n-1) el t de Student.

El crecimiento de las algas se midió a través de un método indirecto de turbidez (absorbancia a 750 nm) al final del ensayo (72 horas de incubación). Las densidades celulares finales en cada uno de los frascos de ensayo (número de células/mL) se obtuvieron a partir de las curvas de calibración diseñadas previamente que relacionan el número de células/mL con los valores de absorbancia.

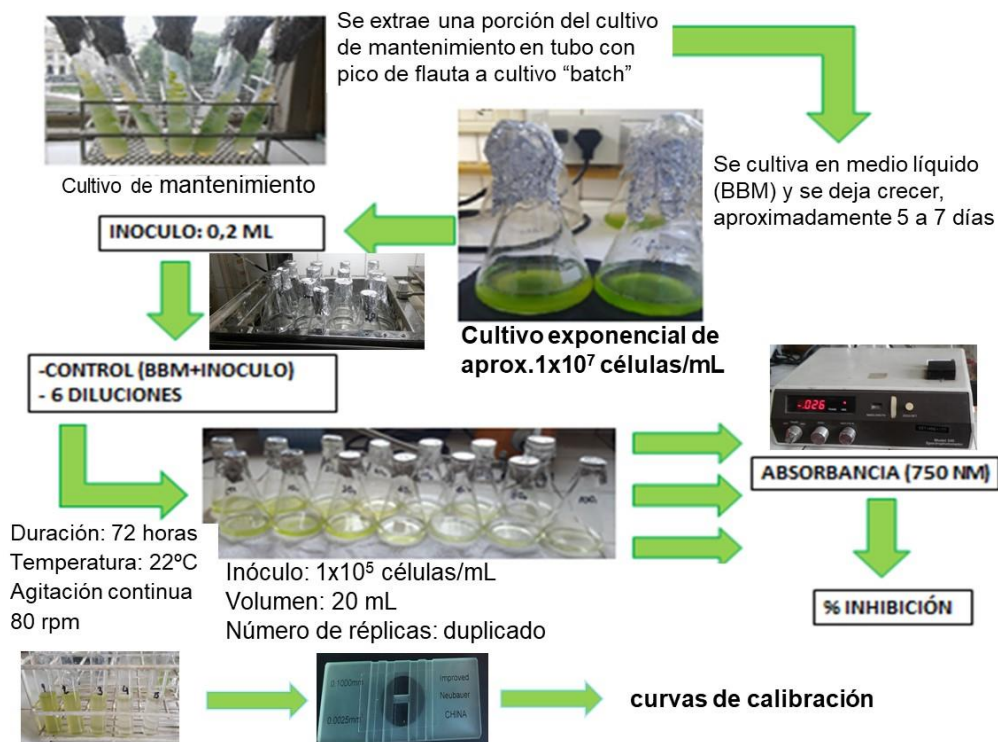


Figura 4: Resumen del procedimiento de preparación de los ensayos de toxicidad.

5) Análisis de datos

A partir de las densidades celulares se calcularon los porcentajes de inhibición del crecimiento de las algas (%I) en cada muestra analizada con respecto al control, según la siguiente ecuación:

$$\%I = 100 \times \frac{(C - T)}{C}$$

Donde C, es la absorbancia medida en los controles y T, la absorbancia medida en cada muestra. Se realizó un análisis de varianza de un factor (ANOVA) para analizar las diferencias significativas a tiempo final entre los porcentajes de inhibición obtenidos en las diferentes concentraciones ensayadas, con un $p < 0,05$.

Asimismo, según el caso, se estimaron las concentraciones efectivas 20 (CE₂₀), 50 (CE₅₀) y 80 (CE₈₀), es decir, las concentraciones de cada fármaco que produce una inhibición del crecimiento de las algas con respecto al crecimiento del control del 20, 50 y 80%, respectivamente. Estas concentraciones se determinaron mediante el ajuste del efecto (valores de inhibición del crecimiento) en función de la concentración de la muestra, siguiendo una clásica ecuación sigmoidea de tipo logística (Magdaleno et al., 2015):

$$Y = A_2 + \frac{A_1 - A_2}{1 + \left(\frac{x}{x_0}\right)^p}$$

Donde p es la pendiente, X_0 es el punto medio de la curva, y $A1$ y $A2$ son las asíntotas máximas y mínimas, respectivamente. Los valores de cada parámetro se obtuvieron mediante la utilización del programa OrigenPro 8.

Se determinaron las NOECs y LOECs utilizando ANOVA de un factor para establecer las diferencias significativas obtenidas en el crecimiento de las algas (número de células/mL) en las diferentes concentraciones ensayadas y el control para cada compuesto y cepa utilizada.

6) Mezclas Binarias

Las mezclas de IBU+DFN se realizaron a partir de las CE_{20} , CE_{50} y CE_{80} obtenidas a partir de los ensayos con estos fármacos de manera individual. Así, para cada cepa se realizaron tres mezclas en las que se probaron las mismas concentraciones simultáneamente. Los ensayos se repitieron por lo menos 5 veces para cada cepa.

Las toxicidades experimentales de las mezclas se compararon con los dos modelos de ecuaciones predictivas de aditividad más ampliamente utilizadas: la Concentración Aditiva (CA) y la Acción Independiente (AI), según Altenburger et al. (2004). El modelo CA asume que cada componente de la mezcla tiene sitios y modos de acción similares, por lo tanto, sigue la siguiente ecuación:

$$\sum_{i=1}^n \frac{C_i}{ECx,i} = 1$$

Donde C_i es la concentración de cada componente “ i ” de un total de “ n ” componentes de la mezcla que muestra una inhibición total $x\%$, y la $EC_{x,i}$ es la concentración del componente “ i ” que produce el mismo efecto ($x\%$) cuando es utilizado individualmente. La fracción $C_i/EC_{x,i}$ (también denominada Unidad Tóxica), y es menor que 1 si el efecto es sinérgico, mayor que 1 si es antagónico, o igual a 1 si el efecto es aditivo.

El modelo AI se basa en la asunción de que cada componente de la mezcla actúa de manera independiente y tiene diferentes sitios y modos de acción. Este concepto implica que el efecto de una sustancia no es modificado por la presencia de otra sustancia. La ecuación que utiliza este modelo para una mezcla binaria es la siguiente:

$$CE_{x,mez} = 1 - [(1 - E(c1)) (1 - E(c2))]$$

Donde Ec_1 y Ec_2 son los efectos de las sustancias individuales y $CE_{x, Mez}$ es el efecto producido por el total de la mezcla.

7) Estimación de riesgo

La estimación del RQ se realizó tanto para los fármacos individuales como para las mezclas utilizando los datos obtenidos de CE_{20} , CE_{50} y CE_{80} y de las concentraciones ambientales de DFN e IBU para los arroyos de la Pcia. de Buenos Aires (Elorriaga et al., 2013 b), según:

$$RQ_x = MEC/CE_x$$

Donde MEC son las concentraciones ambientales de DFN e IBU, y CE_x son las CE_{20} , CE_{50} y CE_{80} . De este modo, se obtuvieron los coeficientes de riesgo para cada concentración inhibitoria (RQ_{20} , RQ_{50} y RQ_{80}). Por otro lado, se compararon estos

resultados con los RQ normalmente utilizados cuando solamente se dispone en la literatura de la CE_{50} para cada tóxico (OECD, 2008; Gonzalez-Pleiter et al., 2013; Aguirre-Martinez et al, 2015). Es decir, se consideraron para este cálculo los valores de CE_{50} obtenidos en esta tesis, los cuales se convirtieron en valores ambientales seguros, según:

$$PNEC=CE_{50}/1000$$

$$RQ=MEC/PNEC$$

$RQ > 1$: indica que existe un riesgo ecológico en el ambiente.

$RQ < 1$: indica que no existe un riesgo ecológico en el ambiente.

Para las mezclas de los dos fármacos se utilizó la siguiente fórmula:

$$RQ_{mix} = \sum MEC_i/CE_{ix}$$

RESULTADOS

1) Curvas de calibración Densidad Celular vs Absorbancia

Las curvas de calibración para determinar la relación entre la densidad celular (número de células/mL) y los datos de turbidez (absorbancia medida a 750 nm) en las tres cepas de algas se muestran en la Figura 5. A partir de estas curvas de regresión lineal, ajustadas al valor cero en ambos ejes, se obtuvieron las ecuaciones correspondientes (Figura 5). Dichas curvas tuvieron buenos ajustes a los datos graficados (R^2 aproximado a 0,97). Por lo tanto, se utilizaron dichas ecuaciones para convertir los datos de absorbancia a densidad celular.

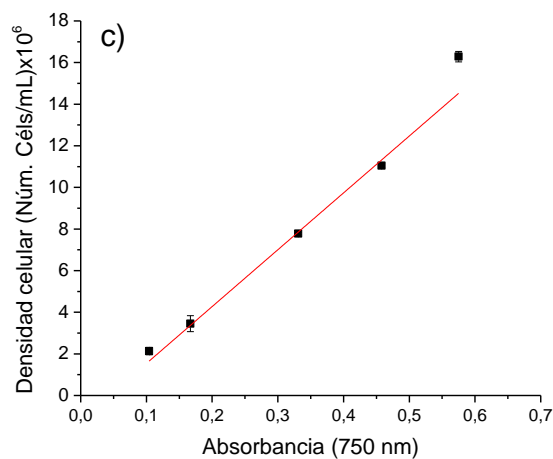
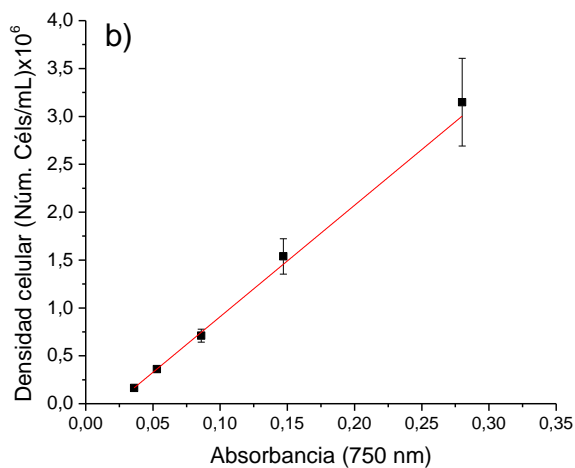
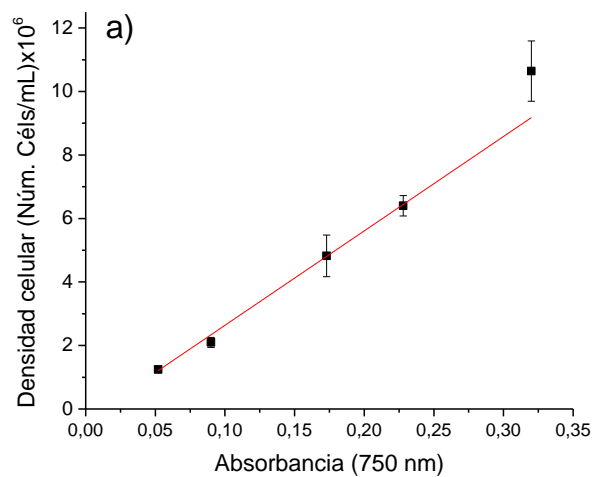


Figura 5. Curvas de calibración entre densidad celular (número de células/mL) y turbidez (absorbancia a 750 nm) para las tres cepas de algas: **a)** *R. subcapitata* ($y=30,504X$, $R^2 = 0,9675$); **b)** *A. fusiformis* ($y=10,704X$; $R^2 = 0,973$), **c)** *S. acutus* ($y=25,847X$; $R^2 = 0,9677$)

2) Toxicidad de DFN e IBU

Las concentraciones seleccionadas para evaluar la inhibición del crecimiento de la cepa estándar *R. subcapitata* fueron 5, 7,5, 10, 15, 20, 30 y 40 mg/L para el DFN y 10, 20, 40, 60, 80 y 100 mg/L para el IBU. Se observaron diferencias significativas ($p < 0,05$) entre los porcentajes de inhibición obtenidos a partir de 10 mg/L (DFN) y 20 mg/L (IBU) con respecto a la menor concentración ensayada. En el caso de la cepa autóctona *A. fusiformis*, las concentraciones de ensayo seleccionadas fueron 5, 10, 20, 40, 60 y 80 mg/L para DFN y 5, 10, 20, 40, 60, 80 y 100 mg/L para el IBU. Se observaron diferencias significativas ($p < 0,05$) entre los porcentajes de inhibición obtenidos a partir de 20 mg/L con respecto a la menor concentración ensayada en ambos fármacos. En la cepa autóctona *S. acutus* se ensayaron las concentraciones de DFN de 20, 40, 60, 80, 100, 120 y 150 mg/L y de IBU de 10, 20, 40, 60, 80 y 100 mg/L, observándose diferencias significativas ($p < 0,05$) entre los porcentajes de inhibición obtenidos a partir de 100 mg/L de DFN y de 80 mg/L de IBU con respecto a las respectivas menores concentraciones ensayadas.

Los %I obtenidos para cada ensayo en función de la concentración para cada fármaco individual se ajustaron a la ecuación sigmoidea logística, cuyos valores de A_1 , A_2 , X_0 , y p y sus respectivos desvíos estándar figuran en la Tabla 1. A partir de estas ecuaciones se obtuvieron los gráficos de dosis-respuestas (Figura 6) y la concentración efectiva 20, 50 y 80. (Tabla 2)

Tabla 1: Parámetros de los ajuste de los efectos (inhibición del crecimiento en porcentaje) y concentración de DFN e IBU para cada cepa, según la curva logística sigmoidea, donde A_1 y A_2 son la asíntotas máximas y mínimas, respectivamente, X_0 es el punto medio de la curva, y p es la pendiente.

	A_1	A_2	X_0	p
Diclofenac				
<i>R. subcapitata</i>	-0,05±2,10	81,48±2,45	7,63±0,34	2,32±0,36
<i>A. fusiformis</i>	14,69±5,07	69,55±2,65	14,57±1,86	2,44±0,76
<i>S. acutus</i>	21,87±2,30	73,65±2,62	85,81±2,46	9,16±2,16
Ibuprofeno				
<i>R. subcapitata</i>	-8,18±5,07	82,29±0,96	18,19±1,16	2,06±0,17
<i>A. fusiformis</i>	24,74±2,14	75,62±3,38	26,67±2,75	2,02±0,39
<i>S. acutus</i>	-11,60±2,62	79,51±6,25	53,19±2,52	2,68±0,45

Se observó un claro efecto dosis-respuesta tanto para el DFN como para el IBU en las tres cepas de algas (Fig. 6), con lo cual los dos fármacos resultaron tóxicos para las mismas. En el caso de *R. subcapitata*, el máximo porcentaje de inhibición alcanzado entre las concentraciones ensayadas para los dos fármacos fue de alrededor del 80% (Tabla 1). Sin embargo, la máxima inhibición se obtuvo para el DFN a los 40 mg/L, mientras que para el IBU ocurrió a partir de los 80 mg/L (Fig. 6a), lo que indica que el primero resultó más tóxico. De este modo, las CE_{20} , CE_{50} y CE_{80} obtenidas para el DFN fueron menores que para el IBU (5,78±1,45 mg/L, 8,03±1,50 mg/L y 11,28±1,76 mg/L, y 11,78±2,39 mg/L, 20,05±5,14 mg/L y 34,26±10,94 mg/L, respectivamente) (Tabla 2).

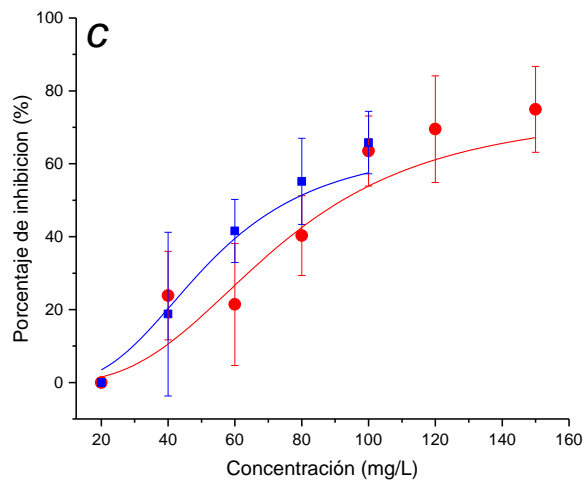
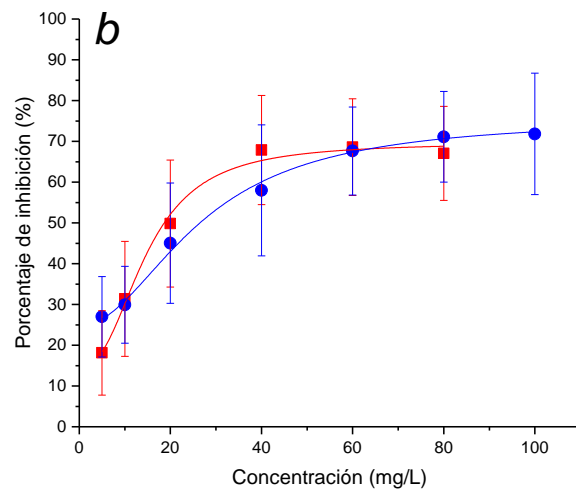
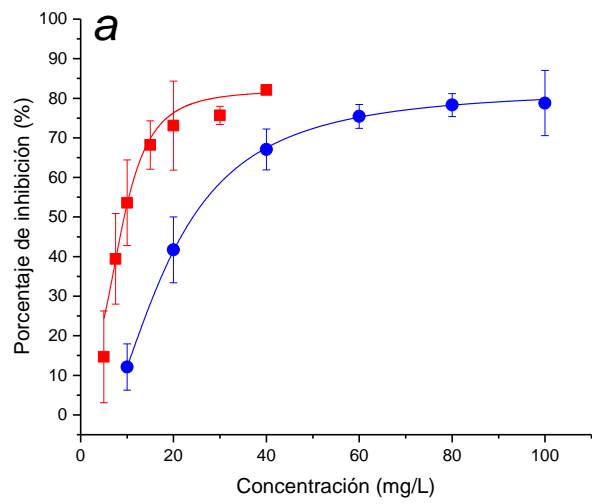


Figura 6: Curvas dosis-respuesta para DFN e IBU en las tres cepas: **a)** *R. subcapitata*, **b)** *A. fusiformis*, y **c)** *S. acutus*. Las barras simbolizan el error estándar. Referencia: DFN (■) e IBU (●)

En el caso de *A. fusiformis*, los porcentajes máximos de inhibición entre las concentraciones ensayadas para el DFN y el IBU se alcanzaron aproximadamente en 70% y 75%, respectivamente (Tabla 1). Las curvas de aproximación sigmoidea fueron muy similares en ambos casos (Fig. 6b). Sin embargo, el DFN resultó más tóxico que el IBU, según los valores de CE_{20} , CE_{50} y CE_{80} obtenidos a partir de dichas curvas ($8,31\pm 2,08$ mg/L, $14,57\pm 1,89$ mg/L y $25,88\pm 4,63$ mg/L, y $13,43\pm 1,87$ mg/L, $26,67\pm 2,75$ mg/L y $52,96\pm 10,31$ mg/L, respectivamente) (Tabla 2). Si se compara el mismo %I máximo alcanzado en ambos casos, el DFN se produjo a 40 mg/L, mientras que el IBU a 80 mg/L.

En el caso de la cepa *S. acutus*, los porcentajes máximos de inhibición entre las concentraciones ensayadas para el DFN y el IBU se alcanzaron aproximadamente en 73% y 79%, respectivamente (Tabla 1). Al comparar estos valores, el IBU alcanzó el máximo %I a 100 mg/L, mientras que el DFN ocurrió a 150 mg/L, con lo cual el primero resultó igual o más tóxico (Fig. 6c). Según las CE_{20} , CE_{50} y CE_{80} obtenidas a partir de las ecuaciones sigmoideas para ambos fármacos, el DFN resultó menos tóxico que el IBU (Tabla 2), siendo sus respectivas CE_{20} de $73,76\pm 3,14$ y $31,73\pm 2,40$ mg/L, CE_{50} de $85,81\pm 2,46$ mg/L y $53,19\pm 2,52$ mg/L, y CE_{80} de $99,83\pm 4,88$ y $89,16\pm 10,67$ mg/L.

Tabla 2: Concentraciones efectivas veinte, cincuenta y ochenta (CE₂₀, CE₅₀ y CE₈₀) en mg/L para el DFN y el IBU en cada cepa. Los valores corresponden a la media y al desvío estándar. Las NOECs y LOECs se expresan en mg/L.

	CE ₂₀	CE ₅₀	CE ₈₀	NOEC	LOEC
Diclofenac					
<i>R. subcapitata</i>	5,78±1,45	8,03±1,5	11,28±1,76	7,5	10
<i>A. fusiformis</i>	8,31±2,08	14,57±1,89	25,88±4,63	10	20
<i>S. acutus</i>	73,76±3,14	85,81±2,46	99,83±4,88	80	100
Ibuprofeno					
<i>R. subcapitata</i>	11,78±2,39	20,05±5,14	34,26±10,94	10	20
<i>A. fusiformis</i>	13,43±1,87	26,67±2,75	52,96±10,31	10	20
<i>S. acutus</i>	31,73±2,40	53,19±2,52	89,16±10,67	40	60

Al comparar la sensibilidad de las tres cepas a los dos fármacos, se pudo observar que la más sensible fue la especie estándar *R. subcapitata* y la más resistente fue *S. acutus*. Por otro lado, la cepa de *A. fusiformis* mostró una sensibilidad intermedia a las otras dos cepas. Estos resultados son consistentes con los valores NOEC y LOEC obtenidos para cada fármaco y cepa ensayada (Tabla 2).

3) Ensayos de toxicidad con los fármacos en mezclas

Para la cepa estándar, *R. subcapitata*, se observó una mayor toxicidad con las mezclas binarias que con los fármacos individuales. Esto se demuestra tanto gráficamente (Fig. 7a) como estadísticamente ($p < 0,05$). Al utilizar los dos modelos de predicción (CA y AI) se vio que ninguno explica el modelo experimental. Por lo tanto, se puede decir que el efecto es sinérgico (Fig. 8a). En el caso de *A. fusiformis*

se pudo observar un mayor efecto tóxico con la mezcla de las CE_{20} de DFN e IBU con respecto a los fármacos individuales ($p < 0,05$), pero este efecto no se observó al mezclar las CE_{50} y CE_{80} ($p > 0,05$) (Fig. 7b). En cuanto a los dos modelos predichos, se pudo observar que cuando ambos fármacos están presentes simultáneamente a bajas concentraciones (CE_{20}) se produciría un efecto sinérgico, mientras que a altas concentraciones (CE_{50} y CE_{80}), se produciría un efecto aditivo (Fig. 8b). En el caso de *S. acutus*, la inhibición del crecimiento fue significativamente ($p < 0,05$) menor en las mezclas CE_{50} y CE_{80} con respecto a la inhibición obtenida para los fármacos individuales (Fig. 7c). Realizando los cálculos de los dos modelos, se observó que ocurriría un efecto antagónico en todas las mezclas (Fig. 8c).

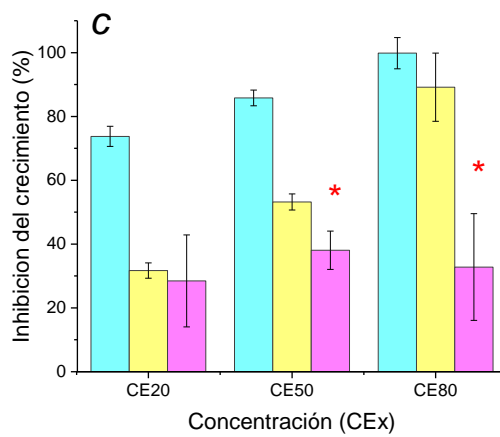
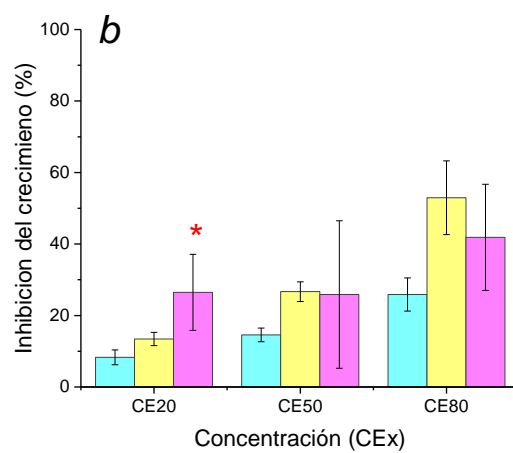
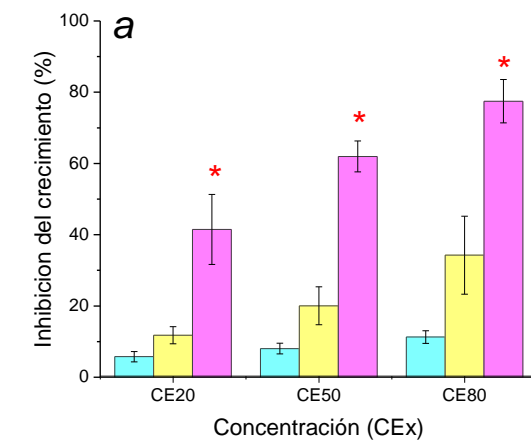


Figura 7: inhibición del crecimiento de las algas (en porcentaje) en función de la concentración efectiva 20, 50 y 80 (CE₂₀, CE₅₀ y CE₈₀) de DFN (■), IBU (■) y sus mezclas (■) en a) *R. subcapitata*, b) *A. fusiformis* y c) *S. acutus*.

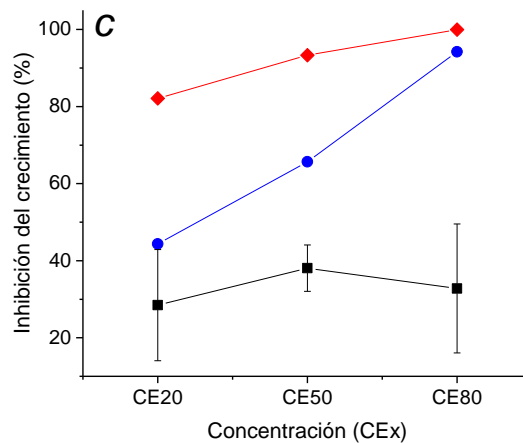
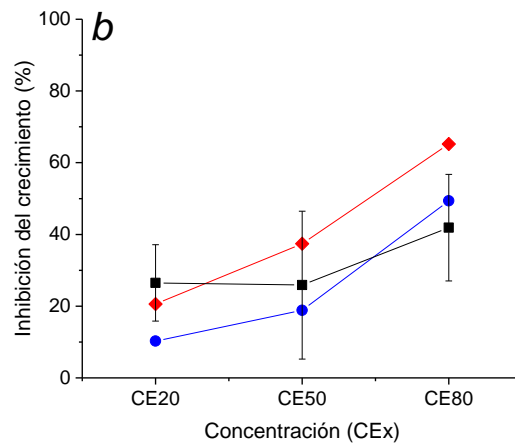
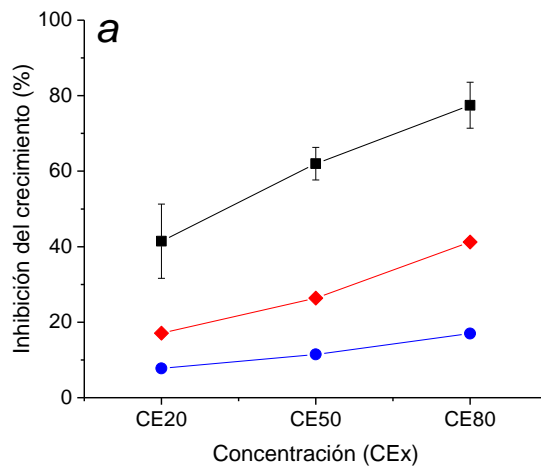


Figura 8: Modelo de Concentración Aditiva (CA) y Modelo de acción Independiente (AI) en mezclas binarias. Para la evaluación de la toxicidad de las mezclas se utilizó la Concentración efectiva 20, 50 y 80. A) *R. subcapitata*, B) *A. fusiformis*, C) *S. acutus*. Referencias: Aditivo (●), Independiente (◆) y Experimental (■)

4) Análisis de Riesgo Ambiental

Los RQ calculados para DFN e IBU y para sus mezclas en cada cepa de alga se detallan en la Tabla 3 y Tabla 4. Estos RQ fueron calculados teniendo en cuenta las CE₂₀, CE₅₀ y CE₈₀. En todos los casos, tanto para los fármacos individuales como para las mezclas, los coeficientes de riesgo resultaron muchos menores que uno (1). De este modo, las concentraciones ambientales de DFN e IBU que hasta ahora fueron halladas en ríos y arroyos de la Pcia. De Buenos Aires no ejercerían un riesgo para el crecimiento de las algas, si están presentes individualmente o ambos simultáneamente.

Tabla 3: Concentración medida en el ambiente (MEC) y cociente de riesgo (RQ) para las cepas *R. subcapitata*, *A. fusiformis* y *S. acutus*

Fármaco	CE ₂₀ (mg L ⁻¹)	CE ₅₀ (mg L ⁻¹)	CE ₈₀ (mg L ⁻¹)	MEC (mg L ⁻¹)	RQ ²⁰	RQ ⁵⁰	RQ ⁸⁰
<i>R. subcapitata</i>							
DFN	5,78	8,03	11,28	0,0005	9x10 ⁻⁵	6x10 ⁻⁵	4x10 ⁻⁵
IBU	11,78	20,05	34,26	0,0096	8x10 ⁻⁴	5x10 ⁻⁴	3x10 ⁻⁴
<i>A. fusiformis</i>							
DFN	8,31	14,57	25,88	0,0005	6x10 ⁻⁵	3x10 ⁻⁵	2x10 ⁻⁵
IBU	13,43	26,67	52,96	0,0096	7x10 ⁻⁴	4x10 ⁻⁴	2x10 ⁻⁴
<i>S. acutus</i>							
DFN	73,76	85,81	99,83	0,0005	7x10 ⁻⁶	6x10 ⁻⁶	5x10 ⁻⁶
IBU	31,73	53,19	89,16	0,0096	3x10 ⁻⁴	2x10 ⁻⁴	1x10 ⁻⁴

Tabla 4: Cociente de riesgo (RQ) en la mezcla de DFN+IBU para las cepas *R. subcapitata*, *A. fusiformis* y *S. acutus*

Fármaco	RQ ₂₀	RQ ₅₀	RQ ₈₀
<i>R. subcapitata</i>			
DFN+IBU	8,9x10 ⁻⁴	5,6x10 ⁻⁴	3,4x10 ⁻⁴
<i>A. fusiformis</i>			
DFN+IBU	7,6x10 ⁻⁴	4,3x10 ⁻⁴	2,2x10 ⁻⁴
<i>S. acutus</i>			
DFN+IBU	3,07x10 ⁻⁴	2,06x10 ⁻⁴	1,05x10 ⁻⁴

Los RQ calculados para los fármacos individuales a partir de las CE₂₀, CE₅₀, CE₈₀ (Tabla 3) se compararon con los obtenidos a partir de las PNEC (CE₅₀/1000) (Tabla 5). En ambos casos, los RQ fueron menores a 1, pero más bajos en el primer caso (Tablas 3 y 5).

Tabla 5: Cociente de riesgo (RQ) para DFN e IBU calculados según OECD (2008) en las cepas *R. subcapitata*, *A. fusiformis* y *S. acutus*

Fármaco	CE ₅₀ (mg L ⁻¹)	PNEC (mg L ⁻¹)	MEC (mg L ⁻¹)	RQ
<i>R. subcapitata</i>				
DFN	8,03	0,008	0,0005	0,062
IBU	20,05	0,020	0,0096	0,48
<i>A. fusiformis</i>				
DFN	14,57	0,015	0,0005	0,034
IBU	26,67	0,027	0,0096	0,36
<i>S. acutus</i>				
DFN	85,81	0,086	0,0005	0,0058
IBU	53,19	0,053	0,0096	0,18

DISCUSIÓN

En el presente estudio se analizaron dos antiinflamatorios no esteroideos de amplio uso en la población humana, el ibuprofeno y el diclofenac, sobre tres cepas de algas verdes. Las tres cepas analizadas mostraron diferentes sensibilidades al ser expuestas a concentraciones crecientes de los dos fármacos en condiciones de laboratorio durante 72 horas. Según los valores de CE_{50} (Tabla 2), la especie *R. subcapitata* fue la cepa más sensible tanto para el DFN ($CE_{50}= 8,03\pm 1,5$ mg/L) como para el IBU ($CE_{50}=20,05\pm 5,14$ mg/L), tal como se esperaba debido a que se trata de la especie estándar. Por otro lado, *S. acutus* resultó ser la cepa más resistente tanto para el DFN ($CE_{50}=85,81\pm 2,46$ mg/L) como para el IBU ($CE_{50}=53,19\pm 2,52$ mg/L). Esta cepa, aislada del arroyo Burgos ubicado en una zona con impacto agrícola y ganadero, fue descrita como un organismo resistente a ciertos contaminantes encontrados en esa zona, como los metales pesados y el glifosato (Afione Di Cristofano et al., 2021). Por otra parte, *A. fusiformis* fue la especie que mostró una sensibilidad intermedia al DFN ($CE_{50}=14,57\pm 1,89$ mg/L) y al IBU ($CE_{50}=26,67\pm 2,46$ mg/L), con respecto a las otras dos cepas estudiadas. *A. fusiformis* fue aislada de un ambiente altamente contaminado como el río Matanza-Riachuelo y demostró una sensibilidad similar a la cepa estándar *R. subcapitata* para los metales pesados, según Magdaleno et al. (2014). Del mismo modo, mostró una cierta sensibilidad a los fármacos IBU y DFN, según los resultados obtenidos en esta tesis. Según Belfiore y Anderson (2001), los organismos vivos pueden sobrevivir a ambientes contaminados con sustancias químicas como resultado de dos procesos diferentes: la aclimatación fisiológica que usualmente resulta de modificaciones en la expresión genética, y la adaptación genética que resulta de la selección natural debido a la presencia de mutaciones que proveen la resistencia apropiada.

Otros autores, como Blaise et al. (2006) y Berrebaan et al. (2017) obtuvieron valores de CE_{50} para el IBU en *R. subcapitata* de 90,5 y 91,28 mg/L, respectivamente, a las 72 horas de exposición. Estos autores realizaron sus ensayos en microplacas de 96 pozos. Por otra parte, Aguirre-Martínez et al. (2015) obtuvieron una CE_{10} de 40,7 mg/L y la máxima concentración ensayada de 500 mg/L no produjo inhibición del 50% del crecimiento a las 96 horas y en tubos de ensayo. De este modo, las CE_{50} obtenidas en este trabajo fueron más bajas para las tres cepas en condiciones de crecimiento donde los volúmenes ensayados fueron mayores (20 mL) a los utilizados en los trabajos citados previamente (0,2 y 3 mL). Asimismo, Geiger et al. (2016) obtuvieron una CE_{50} de 89,65 mg/L para el IBU en el alga verde *Chlorella vulgaris*, también mayor a las obtenidas para las tres cepas en este trabajo.

En cuanto al DFN, Wimmerova et al. (2022) obtuvieron una CE_{50} en *R. subcapitata* de 177,68 mg/L a las 72 horas (en frascos Erlenmeyers). De esta manera, las CE_{50} obtenidas en nuestro trabajo fueron también más bajas para las tres cepas, es decir mostraron una mayor toxicidad ante el DFN. Otros autores como Majewska et al. (2018) obtuvieron una CE_{50} de 134,0 mg/L en el alga verde *Chlamydomonas reinhardtii*, que también fue más alta, probablemente debido a que dichos autores utilizaron un inóculo diez veces mayor al utilizado en esta Tesis. Se ha demostrado que los volúmenes de ensayo y el tamaño del inóculo inciden en variaciones en los resultados de toxicidad, siendo la toxicidad de las sustancias menor cuando es menor el volumen del medio nutritivo de ensayo, y también menor cuando aumenta la densidad celular inicial desde 10^2 a 10^5 células/mL (Franklin et al., 2002). En general, el volumen de ensayo debe ser tal que permita un buen intercambio de gases entre las fases líquida y gaseosa del recipiente.

Las CE_{20} , CE_{50} y CE_{80} pueden ser utilizadas como parámetros que permiten evaluar la peligrosidad de los contaminantes en el ambiente acuático para determinado organismo. Del mismo modo, Cleuvers (2004) estimó estas tres concentraciones para el DFN y el IBU en el alga verde *Desmodesmus subspicatus*, las cuales fueron de 56,1, 71,9 y 92,2 mg/L para el DFN y de 155,5, 342,2 y 753,2 mg/L para el IBU, respectivamente. Es decir que las CE_{20} , CE_{50} y CE_{80} obtenidas por dicho autor para el DFN fueron más altas que las obtenidas en esta tesis para *R. subcapitata* y *A. fusiformis*, pero más parecidas a para *S. acutus* (Tabla 2). Asimismo, las CE_{20} , CE_{50} y CE_{80} obtenidas por dicho autor para el IBU en *D. subspicatus* fueron mucho más altas que las obtenidas para las algas estudiadas en el presente trabajo. Las diferentes respuestas obtenidas en las especies de algas pueden deberse a diferencias en las características morfológicas, tales como la estructura de la pared celular, o a diferentes mecanismos de evasión a los compuestos químicos (Zhou et al., 2008; Kalinowska y Pawlik-Skowronska, 2010). Asimismo, existen diferencias especie específicas respecto a la tolerancia a los químicos (Yang et al., 2021).

Teniendo en cuenta los valores de CE_{50} , una directiva técnica de la Comisión de las Comunidades Europeas (“EU-Directive 93/67/EEC”), orientada a la evaluación de riesgos de nuevas sustancias notificadas en el ambiente, clasifica a estas sustancias como muy tóxicas, tóxicas y dañinas para los organismos, según esa concentración sea menor a 1 mg/L, o se encuentre entre 1 y 10 mg/L, o entre 10 y 100 mg/L, respectivamente. Las sustancias cuyas CE_{50} están por encima de 100 mg/L se consideran no clasificables (Commission of the European Communities, 1996). En nuestro trabajo, los fármacos IBU y DFN mostraron distintas toxicidades para las tres cepas y, por lo tanto, distintas clasificaciones. De acuerdo con nuestros resultados (Tabla 2), el DFN para *R. subcapitata* se podría clasificar como tóxico,

mientras que para *A. fusiformis* y *S. acutus* se clasificaría como dañino. Por otro lado, el IBU se clasificaría como sustancia dañina para todas las cepas estudiadas.

Algunos autores han demostrado que el DFN produce inhibición del rendimiento fotosintético en el alga verde *Chlamydomonas reinhardtii* debido al silenciamiento de los centros de reacción del fotosistema II (Majewska et al., 2018). Por otro lado, Wang et al. (2020) observaron que al aumentar la concentración de IBU, disminuye el contenido de los pigmentos fotosintéticos (clorofilas *a* y *b*, y carotenoides) en *Scenedesmus obliquus*. Asimismo, dichos autores demostraron que el cloroplasto y el funcionamiento mitocondrial se ven afectados por incrementos en las concentraciones de IBU, lo que reduce la actividad fotosintética y la frecuencia respiratoria y, en consecuencia, se reduce el consumo de O₂.

En general, los organismos en el medio ambiente acuático suelen estar expuestos simultáneamente a una mezcla de diferentes químicos, entre ellos los productos farmacéuticos que llegan a través de los líquidos residuales domiciliarios. Dichas mezclas pueden ejercer efectos tóxicos mayores o menores que los compuestos individuales presentes en las mismas. En este trabajo, las mezclas de DFN+IBU mostraron una toxicidad mayor con respecto a la toxicidad de los fármacos individuales en la cepa estándar *R. subcapitata* (Figura 7a). Por el contrario, la toxicidad de las mezclas a las CE₅₀ y CE₈₀ fue menor en *S. acutus* que las obtenidas individualmente (Figura 7c). En el caso de *A. fusiformis*, solamente en la mezcla de las CE₂₀ de ambos fármacos, la toxicidad fue mayor que las CE₂₀ obtenidas para cada fármaco ensayado individualmente (Figura 7b).

Al comparar los resultados de las mezclas con los modelos aditivo e independiente, pudo evidenciarse que ninguno de los dos modelos explica los

resultados obtenidos para *R. subcapitata* (Fig. 8a). Los resultados experimentales mostraron una inhibición significativamente mayor que lo que se obtuvo en ambos modelos, lo que sugiere que el efecto de las mezclas de IBU+DFN tendrían un efecto sinérgico para la cepa estándar. En el caso de *S. acutus* (Fig. 8c), tampoco los modelos explicaron los resultados obtenidos para las mezclas, pero en este caso, la inhibición observada experimentalmente fue significativamente menor que la predicha por ambos modelos, lo que sugiere un posible efecto antagónico. En el caso de *A. fusiformis*, el modelo aditivo podría explicar los resultados obtenidos experimentalmente en las concentraciones CE_{50} y CE_{80} , mientras que el modelo independiente explicaría los resultados de las mezclas de las CE_{20} (Fig. 8b), lo que sugiere que en ninguna de las mezclas podría producirse antagonismo o sinergismo en esta cepa. Cleuvers (2003) demostró que el efecto combinado de DFN e IBU resultaría aditivo en el caso del alga verde *Desmodesmus subspicatus*, al igual que ocurriría con nuestra cepa autóctona *A. fusiformis*.

Históricamente, las CE_{10} y CE_{20} han sido consideradas como análogos de la concentración de no efecto (NOEC) (Beasley et al., 2015), y los riesgos asociados a esos valores están relacionados a los efectos crónicos de las sustancias. De esta forma, esas concentraciones podrían considerarse ambientalmente relevantes ya que establecen un umbral de protección para los organismos. Esto puede representar una verdadera amenaza para los organismos no blanco. Por otra parte, los valores de CE_{50} se relacionan frecuentemente con los efectos agudos. En la presente tesis, evaluamos tanto los efectos crónicos (como CE_{20}) como los agudos (como CE_{50}) para comparar las dos situaciones a las que pueden estar expuestas las poblaciones de algas. Teniendo en cuenta ambas situaciones, no se produciría un riesgo para la inhibición del crecimiento de las algas teniendo en cuenta las

concentraciones de IBU y DFN (Tablas 3 y 4) halladas por Elorriaga et al. (2013 b) en diferentes arroyos de la Provincia de Buenos Aires. Es decir, las concentraciones ambientales no producirían inhibición del crecimiento de las algas.

Cabe destacar que el riesgo analizado a partir del RQ no considera todas las variables ambientales involucradas, tales como la disponibilidad de nutrientes y de luz, las variaciones de temperatura, el efecto de la predación, la presencia de otros contaminantes, entre otros. El RQ se obtiene a partir de bioensayos realizados en las mejores condiciones posibles dadas en el laboratorio, tales como luz continua, temperatura óptima y disponibilidad de macro y micronutrientes, ausencia de predación, etc. Por todo esto, a pesar de haber obtenido valores de RQ menores a 1, el riesgo para el crecimiento de las algas en el ambiente podría ser mayor. Por otro lado, el medio nutritivo BBM contiene concentraciones de nutrientes comparativamente más altas que las de los medios utilizados en los protocolos estandarizados por las agencias internacionales (USEPA, 2002; Environmental Canada, 2007; ISO, 2009). Se sabe que las mayores concentraciones de nutrientes estimulan el crecimiento de las algas y reducen la toxicidad de las sustancias (Stauber y Florence, 1989). De todos modos, en la región Pampeana las aguas superficiales se encuentran generalmente eutrofizadas, por lo que fue conveniente utilizar un medio rico en nutrientes para obtener resultados de ensayos más reales, especialmente para las cepas autóctonas (Afione Di Cristofano et al., 2021).

Aguirre-Martinez et al. (2015) realizaron baterías de ensayos con organismos representativos de diferentes eslabones de la cadena trófica: la bacteria *Vibrio fischeri*, la microalga *Raphidocelis subcapitata* y el erizo de mar *Paracentrotus lividus*. A partir de los RQ estimados para varios fármacos (IBU, carbamazepina, novobiocina), se determinó que las bacterias y las algas no se encontrarían en

riesgo ambiental, pero sí el erizo de mar, teniendo en cuenta las concentraciones ambientales. Esto hace suponer que, si bien en el presente estudio, tanto el IBU como el DFN no producirían inhibición del crecimiento de las algas, podrían no serlo para los organismos ubicados en eslabones superiores de la cadena trófica. Por otra parte, debe tenerse en cuenta que a pesar de que las concentraciones de estos compuestos en el ambiente acuático son muy bajas, su liberación es constante, por lo que los organismos vivos se encuentran permanentemente en contacto con los mismos. Por ello resulta necesario incorporar ensayos crónicos a la batería de ensayos para establecer un nivel de riesgo más aproximado (Craner et al., 2006).

Por todo lo expuesto en esta tesis, las algas son un componente importante en los ecosistemas acuáticos, ya que son los principales productores primarios, producen oxígeno y sustancias orgánicas y proporcionan alimento a otros organismos. Los efectos de las sustancias tóxicas sobre las algas verdes pueden resultar perjudiciales sobre la estructura y función de un ecosistema, lo que resulta en el agotamiento del oxígeno y la disminución de la productividad primaria (Ma et al, 2006). En este trabajo se evidenció que ciertos fármacos, tales como el IBU y DFN, ejercen efectos inhibitorios sobre el crecimiento de las algas, lo que podría afectar a la estructura los ecosistemas acuáticos. Estos compuestos también podrían bioacumularse y biomagnificarse a través de las cadenas tróficas y afectar nuestro consumo propio. Es por este motivo que resulta necesario una mayor investigación sobre los efectos de este tipo de contaminantes sobre diferentes grupos de organismos. Asimismo, resulta igualmente necesaria la incorporación de cepas nativas para valorar los distintos efectos tóxicos.

CONCLUSIONES

A partir de este trabajo se llegaron a las siguientes conclusiones:

- El IBU y el DFN inhiben el crecimiento de las cepas de algas verdes *R. subcapitata*, *A. fusiformis* y *S. acutus*.
- De las tres cepas de algas verdes, la que muestra mayor sensibilidad es la cepa estándar *R. subcapitata*, seguida por las cepas autóctonas *A. fusiformis* y *S. acutus*, en ese orden.
- El diclofenac es más tóxico que el ibuprofeno para *R. subcapitata* y *A. fusiformis*, mientras que el ibuprofeno es más tóxico en *S. acutus*. Estas diferencias podrían deberse a variaciones especie específicas y a los distintos mecanismos morfológicos y fisiológicos de tolerancia a los contaminantes.
- Las mezclas binarias de IBU+DFN producen un efecto sinérgico para la inhibición del crecimiento en *R. subcapitata*, mientras que dichas mezclas producen un efecto antagónico en la cepa autóctona *S. acutus*. En *A. fusiformis* el efecto de dichas mezclas es aditivo.
- Las tres cepas de algas, *R. subcapitata*, *A. fusiformis* y *S. acutus*, no se encuentran en riesgo de inhibir su crecimiento ante la presencia de concentraciones ambientales de IBU y DFN en aguas superficiales.
- A pesar de que los fármacos IBU y DFN son tóxicos para las tres cepas, las concentraciones ambientales son muy bajas, de modo que las algas no se encontrarían en riesgo para su crecimiento.

BIBLIOGRAFÍA

- Afione Di Cristofano, C., Juárez, Á. B., Moretton, J., Magdaleno, A. (2021). Effects of heavy metals, glyphosate and their binary mixtures on the growth of green algae. *Ecología Austral*, 31(1), 053-064.
- 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.
- Altenburger, R., Walter, H., Grote, M. (2004). What contributes to the combined effect of a complex mixture?. *Environmental Science y Technology*, 38(23), 6353-6362.
- Amariei, G., Boltes, K., Rosal, R., Letón, P. (2017). Toxicological interactions of ibuprofen and triclosan on biological activity of activated sludge. *Journal of hazardous materials*, 334, 193-200.
- Archibald, P. A., y Bold, H. C. (1970). *Phycological Studies--XI. The Genus Chlorococcum Meneghini*. University of Texas at Austin.
- Ashton, D., Hilton, M., Thomas, K.V. (2004). Investigating the environmental transport of human pharmaceuticals to streams in the United Kingdom. *Science of the total environment*. 333(1-3), 167 – 184.
- Aus der Beek, T., Weber, F.A., Bergmann, A., Hickmann, S., Ebert, I., Hein, A., Küster, A. (2016). Pharmaceuticals in the environment—Global occurrences and perspectives. *Environmental toxicology and chemistry*, 35(4), 823-835.
- Bácsi, I., Viktória, B., Kókai, Z., Gonda, S., Novák, Z., Nagy, S. A., Vasas, G. (2016). Effects of non-steroidal anti-inflammatory drugs on cyanobacteria and algae in laboratory strains and in natural algal assemblages. *Environmental Pollution*, 212, 508-518.
- Backhaus, T., Scholze, M., Grimme, LH (2000). The single substance and mixture toxicity of quinolones to the bioluminescent bacterium *Vibrio fischeri*. *Aquatic Toxicology*, 49 (1-2), 49-61.
- Backhaus, T., Sumpter, J., Blanck, H. (2008). On the ecotoxicology of pharmaceutical mixtures. In *Pharmaceuticals in the Environment*. Springer, Berlin, Heidelberg. (pp. 257-276).
- Blaise, C., Gagné, F., Eullaffroy, P., Férard, J. F. (2006). Ecotoxicity of selected pharmaceuticals of urban origin discharged to the Saint-Lawrence river (Québec, Canada): a review. *Brazilian Journal of Aquatic Science and Technology*, 10(2), 29-51.
- Blinova, I. (2004). Use of freshwater algae and duckweeds for phytotoxicity testing. *Environmental Toxicology*, 19(4), 425-428.
- Beasley, A., Belanger, S.E., Brill, J.L., Otter, R.R. (2015). Evaluation and comparison of the relationship between NOEC and EC10 or EC20 values in chronic *Daphnia* toxicity testing. *Environmental toxicology and chemistry*, 34(10), 2378-2384.
- Belfiore, N.M., Anderson, S.L. (2001) Effects of contaminants on genetic patterns in aquatic organisms: a review. *Mutat Res* 489:97–122.

- Berrebaan, I., Montassir, L., Said, B., Mustapha, E., Bessi, H. (2017). Evaluation of ecotoxicity of ibuprofen and paracetamol on the freshwater green microalgae "*Pseudokirchneriella subcapitata*". Eng technol J, 2, 303-309.
- Benotti, M.J., y Brownawell, B.J. (2009). Microbial degradation of pharmaceuticals in estuarine and coastal seawater. Environmental Pollution, 157(3), 994-1002.
- Bolong, N., Ismail, A.F., Salim, M. R., Matsuura, T. (2009). A review of the effects of emerging contaminants in wastewater and options for their removal. Desalination, 239(1-3), 229-246.
- Broderius, S. J., Kahl, M. D., Elonen, G. E., Hammermeister, D. E., Hoglund, M. D. (2005). A comparison of the lethal and sublethal toxicity of organic chemical mixtures to the fathead minnow (*Pimephales promelas*). Environmental Toxicology and Chemistry: An International Journal, 24(12), 3117-3127.
- Carusso, S., Juárez, A. B., Moretton, J., Magdaleno, A. (2018). Effects of three veterinary antibiotics and their binary mixtures on two green alga species. Chemosphere, 194, 821-827.
- Castillo Morales, G. (2004). Ensayos toxicológicos y métodos de evaluación de calidad de aguas. Estandarización, intercalibración, resultados y aplicaciones. Castillo Morales, G. (Ed). 177 p.
- 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.
- Crane, M., Watts, C., Boucard, T. (2006). Chronic aquatic environmental risks from exposure to human pharmaceuticals. Sci. Total Environ. 367, 23–41
- 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.
- Di Marzio, W., Sáenz, M.E. (2013). Ecotoxicología. Eudeba Primera Edición, Buenos Aires. 368 p.
- Elorriaga, Y., Marino, D.J., Carriquiriborde, P. and Ronco, A.E. (2013a) Human pharmaceuticals in wastewaters from urbanized areas of Argentina. Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology. 90, 397–400.
- Elorriaga, Y., Marino, D. J., Carriquiriborde, P., Ronco, A. E. (2013b). Screening of pharmaceuticals in surface water bodies of the Pampas region of Argentina. International Journal of Environment and Health, 6(4), 330-339.
- Environmental Canada (2007) Biological test method: Growth inhibition test using afreshwater algae. EPS 1/RM/25 Second Edition. 53 p.
- Feng, L., van Hullebusch, E.D., Rodrigo, M. A., Esposito, G., Oturan, M.A. (2013). Removal of residual anti-inflammatory and analgesic pharmaceuticals from aqueous systems by electrochemical advanced oxidation processes. A review. Chemical Engineering Journal, 228, 944-964.
- Franklin, N. M., Stauber, J. L., Apte, S. C., Lim, R. P. (2002). Effect of initial cell density on the bioavailability and toxicity of copper in microalgal bioassays. Environmental Toxicology and Chemistry: An International Journal, 21(4), 742-751.

- Geiger, E., Hornek-Gausterer, R., Saçan, M. T. (2016). Single and mixture toxicity of pharmaceuticals and chlorophenols to freshwater algae *Chlorella vulgaris*. *Ecotoxicology and environmental safety*, 129, 189-198.
- Geis, S. W., Fleming, K. L., Korthals, E. T., Searle, G., Reynolds, L., Karner, D. A. (2000). Modifications to the algal growth inhibition test for use as a regulatory assay. *Environmental Toxicology and Chemistry: An International Journal*, 19(1), 36-41.
- Gibson, R., Durán-Álvarez, J.C., Estrada, K.L., Chávez, A., Cisneros, B.J. (2010). Accumulation and leaching potential of some pharmaceuticals and potential endocrine disruptors in soils irrigated with wastewater in the Tula Valley, Mexico. *Chemosphere*, 81 (11), 1437-1445.
- Ginebreda, A., Muñoz, I., de Alda, M. L., Brix, R., López-Doval, J., Barceló, D. (2010). Environmental risk assessment of pharmaceuticals in rivers: relationships between hazard indexes and aquatic macroinvertebrate diversity indexes in the Llobregat River (NE Spain). *Environment international*, 36(2), 153-162.
- González-Pleiter, M., Gonzalo, S., Rodea-Palomares, I., Leganés, F., Rosal, R., Boltes, K., Fernández-Piñas, F. (2013). Toxicity of five antibiotics and their mixtures towards photosynthetic aquatic organisms: implications for environmental risk assessment. *Water research*, 47(6), 2050-2064.
- Guéguen, C., Gilbin, R., Pardos, M., Dominik, J. (2004). Water toxicity and metal contamination assessment of a polluted river: the Upper Vistula River (Poland). *Applied Geochemistry*, 19(1), 153-162.
- Heberer, T. (2002). Occurrence, fate, and removal of pharmaceutical residues in the aquatic environment: a review of recent research data. *Toxicology letters*, 131(1-2), 5-17.
- Helenkár, A., Sebők, Á., Záray, G., Molnár-Perl, I., Vasánits-Zsigrai, A. (2010). The role of the acquisition methods in the analysis of the non-steroidal anti-inflammatory drugs in Danube River by gas chromatography-mass spectrometry. *Talanta*, 82(2), 600-607.
- Henschel, K. P., Wenzel, A., Diedrich, M., Fliedner, A. (1997). Environmental hazard assessment of pharmaceuticals. *Regulatory toxicology and Pharmacology*, 25(3), 220-225.
- Huerta, B., Rodríguez-Mozaz, S., Barcelo, D. (2013). Analysis of pharmaceutical compounds in biota. In *Comprehensive Analytical Chemistry*. Elsevier. p 169-193.
- ISO (2009) Water quality - Freshwater Algal Growth Inhibition Test with Unicellular Green Algae, revision.
- Jjemba, P. K. (2006). Excretion and ecotoxicity of pharmaceutical and personal care products in the environment. *Ecotoxicology and environmental safety*, 63(1), 113-130.
- Jones, O. A., Lester, J. N., Voulvoulis, N. (2005). Pharmaceuticals: a threat to drinking water?. *Trends in Biotechnology*, 23(4), 163-167.
- Jørgensen, S.E., Halling Sørensen, B., Mahler, H. (1998). *Handbook of Estimation methods in Ecotoxicology and Environmental Chemistry*. Lewis Publishers, Boca Ratón. USA. 229 pp.
- Kahru, A., Ivask, A., Kasemets, K., Pollumaa, L., Kurvet, I., François, M., Dubourguier, H.C. (2005). Biotests and biosensors in ecotoxicological risk assessment of field soils polluted with zinc, lead, and cadmium. *Environmental Toxicology and Chemistry: An International Journal*, 24(11), 2973-2982.

- Kalinowska, R., Pawlik-Skowronska, B. (2010) Response of two terrestrial green microalgae (Chlorophyta, Trebouxiophyceae) isolated from Cu-rich and unpolluted soils to copper stress. *Environ Pollut* 158:2778–2785.
- Khetan, SK y Collins, TJ (2007). Human pharmaceuticals in the aquatic environment: a challenge to green chemistry. *Chemical reviews*, 107 (6), 2319-2364.
- Komarek, J., y Marvan, P. (1979). Selection and registration of strains of algae as assay organisms. In *Algal assays and monitoring eutrophication* Stuttgart: Schweizerbart. (pp. 87-102).
- Kümmerer, K., (2009). Antibiotics in the aquatic environment e a review e Part I. *Chemosphere* 75, 417-434.
- Li, W. C. (2014). Occurrence, sources, and fate of pharmaceuticals in aquatic environment and soil. *Environmental pollution*, 187, 193-201.
- Ma, J., Wang, S., Wang, P., Ma, L., Chen, X., & Xu, R. (2006). Toxicity assessment of 40 herbicides to the green alga *Raphidocelis subcapitata*. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 63(3), 456-462.
- Magdaleno, A., Vélez, C. G., Wenzel, M. T., Tell, G. (2014). Effects of cadmium, copper and zinc on growth of four isolated algae from a highly polluted Argentina river. *Bulletin of environmental contamination and toxicology*, 92(2), 202-207.
- Magdaleno, A., Saenz, M.E., Juárez, A.B., Moretton, J. (2015). Effects of six antibiotics and their binary mixtures on growth of *Pseudokirchneriella subcapitata*. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 113, 72-78.
- Majewska, M., Harshkova, D., Gu´sciara, M., Aksmann, A., (2018). Phytotoxic activity of diclofenac: evaluation using a model green alga *Chlamydomonas reinhardtii* with atrazine as a reference substance. *Chemosphere* 209, 989–997.
- Menzer, R. E. (1991). Water and soil pollutants. En: Casarret and Doull 's *Toxicology, the basic science of poisons*. vol. 4, p. 872-902.
- Moriarty, F. (1984). *Ecotoxicología. El estudio de contaminantes en ecosistemas*. Ed. Academis, León, España, 248 pp
- Nowell, L.H., Norman, J.E., Moran, P.W., Martin, J.D. y Stone, W.W. (2014). Pesticide Toxicity Index—A tool for assessing potential toxicity of pesticide mixtures to freshwater aquatic organisms. *Sc. Tot. Environ.* 476, 477: 144–157.
- OECD (2006). *Guidelines for the testing of chemicals. Proposal for updating guideline 201: Freshwater alga and Cyanobacteria, growth Inhibition Test*. OECD Publications Service, Paris.
- OECD (2008). *Guidelines for the Testing of Chemicals, No.23: Guidance Document on Aquatic Toxicity Testing of Difficult Substances and Mixtures*. PDF Edition (ISSN 1607-310X), 18th Addendu.
- Quintana, J.B., Weiss, S. y Reemtsma, T. (2005). Pathways and metabolites of microbial degradation of selected acidic pharmaceutical and their occurrence in municipal wastewater treated by a membrane bioreactor. *Water Research*, 39 (12), 2654-2664.
- Santos, L.H., Araújo, A.N., Fachini, A., Pena, A., Delerue-Matos, C., Montenegro, M.C.B.S.M. (2010). Ecotoxicological aspects related to the presence of pharmaceuticals in the aquatic environment. *J Hazard Mater*, 175 (1-3), 45-95.
- Stauber, JL y Florencia, TM (1989). The effect of culture medium on metal toxicity to the marine diatom *Nitzschia closterium* and the freshwater green alga *Chlorella pyrenoidosa*. *Water Research*, 23 (7), 907-911.

- Stauber, J.L. (1995). Toxicity testing using marine and freshwater unicellular algae. *Australasian journal of ecotoxicology*. 1:15-24.
- Stumpf, M., Ternes, T.A., Wilken, R.D., Rodrigues, S.V., Baumann, W. (1999). Polar drug residues in sewage and natural waters in the state of Rio de Janeiro, Brazil. *Sci. Total Environ.*, 225 (1-2), 135-141.
- Suzuki, S., Yamaguchi, H., Nakajima, N., Kawachi, M. (2018). *Raphidocelis subcapitata* (= *Pseudokirchneriella subcapitata*) provides an insight into genome evolution and environmental adaptations in the Sphaeropleales. *Scientific Reports*, 8 (1), 1-13.
- Szymonik, A., Lach, J. (2012). Zagrozenie srodowiska wodnego obecnością srodkow farmaceutycznych. *Inzynieria Ochr. srodowiska* 15 (3), 249-263
- Ternes, TA, Hirsch, R., Mueller, J., Haberer, K. (1998). Methods for the determination of neutral drugs as well as betablockers and β 2-sympathomimetics in aqueous matrices using GC/MS and LC/MS/MS. *Fresenius' Journal of Analytical Chemistry*, 362 (3), 329-340.
- Thomas, P.M. y Foster, G.D. (2004). Determination of nonsteroidal anti-inflammatory drugs, caffeine, and triclosan in wastewater by gas chromatography-mass spectrometry. *J. Environ. Sci. Health A Tox. Hazard. Subst. Environ. Eng.* 39 (8), 1969-1978.
- USEPA (2002). *Selenastrum capricornutum* growth test. In Short-term method for estimating the chronic toxicity of effluents and receiving water to freshwater organisms. USA.
- USEPA (2008a). SAB Advisory on Aquatic Life Water Quality Criteria for Contaminants of Emerging Concern. U.S. EPA, Washington, D.C. EPA-SAB-09-007.
- USEPA (2008b). OW/ORD Emerging Contaminants Workgroup (2008). White Paper: Aquatic Life Criteria for Contaminants of Emerging Concern. US EPA, Washington, D.C
- Van den Brandhof, E.J. y Montforts, M. (2010). Fish embryo toxicity of carbamazepine, diclofenac and metoprolol. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 73 (8), 1862-1866.
- Vásquez, M.I., Lambrianides, A., Schneider, M., Kümmerer, K. y Fatta-Kassinos, D. (2014). Environmental side effects of pharmaceutical cocktails: what we know and what we should know. *J Hazard Mater.* 30(279):169-89.
- Von der Ohe, P.C., Dulio, V., Slobodnik, J., De Deckere, E., Kühne, R., Ebert, RU, Brack, W. (2011). A new risk assessment approach for the prioritization of 500 classical and emerging organic microcontaminants as potential river basin specific pollutants under the European Water Framework Directive. *Science of the Total Environment*, 409(11), 2064-2077
- Wang, H., Jin, M., Mao, W., Chen, C., Fu, L., Li, Z., Liu, H. (2020). Photosynthetic toxicity of non-steroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs) on green algae *Scenedesmus obliquus*. *Science of the total environment*, 707, 136-176.
- Weigel, S., Kallenborn, R. y Hühnerfuss, H. (2004). Simultaneous solid-phase extraction of acidic, neutral and basic pharmaceuticals from aqueous samples at ambient (neutral) pH and their determination by gas chromatography–mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, 1023 (2), 183-195.
- Wimmerova, L., Solcova, O., Spacilova, M., Cehajic, N., Krejcikova, S. y Marsik, P. (2022). Toxicity assessment and treatment options of Diclofenac and Triclosan dissolved in water. *Toxics*, 10(8), 422

- World Resources (1996). La guía global del medio ambiente. Población y medio ambiente. Editorial Ecoespaña, Madrid, 424 pp.
- Yamamoto, H., Nakamura, Y., Moriguchi, S., Nakamura, Y., Honda, Y., Tamura, I., Sekizawa, J. (2009). Persistence and partitioning of eight selected pharmaceuticals in the aquatic environment: laboratory photolysis, biodegradation, and sorption experiments. *Water Research*, 43(2), 351-362.
- Yang, W., Gao, X., Wu, Y., Wan, L., Lu, C., Huang, J., Chen, H., Yang, Y., Ding, H., Zhang, W. (2021). Chemical- and species-specific toxicity of nonylphenol and octylphenol to microalgae *Chlorella pyrenoidosa* and *Scenedesmus obliquus*. *Toxicology and Pharmacology*, 81, 103517.
- Ziylan, A. y Ince, N.H. (2011). The occurrence and fate of anti-inflammatory and analgesic pharmaceuticals in sewage and fresh water: treatability by conventional and non-conventional processes. *J Hazard Mater*, 187(1-3), 24-36.
- Zhao, J. L., Ying, G. G., Liu, Y. S., Chen, F., Yang, J. F., Wang, L., Warne, M. S. J. (2010). Occurrence and a screening-level risk assessment of human pharmaceuticals in the Pearl River system, South China. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 29(6), 1377-1384.
- Zhou, Q., Zhang, J., Fu, J., Shi, J., Jiang, G. (2008) Review. Biomonitoring: an appealing tool for assessment of metal pollution in the aquatic ecosystem. *Anal Chim Acta* 606:135–150.

ANEXO

Tabla I: Características y propiedades físico-químicas del diclofenac e ibuprofeno

Diclofenac

Fórmula química	C ₁₄ H ₁₁ C ₂ NO ₂
Peso molecular (g/mol)	296.2
Número CAS	15307-79-6
Pka	4.91
Solubilidad (mg/L)	2
Uso común	Analgésico
Proporción excretado	65%

Ibuprofeno

Fórmula química	C ₁₃ H ₁₈ O ₂
Peso molecular (g/mol)	206.3
Número CAS	15687-27-1
Pka	4.15
Solubilidad (mg/L)	21
Uso común	Analgésico
Proporción excretado	90%

Tabla II: Composición de macro y micronutrientes del medio mineral Bold's Basal Medium (BBM).

Solución nutritiva stock	Compuesto	Cantidad disuelta en 1 litro de agua destilada
Macronutrientes		
(1)	NaNO ₃	5 g
(2)	MgSO ₄ .7H ₂ O	1,5 g
(3)	NaCl	0,5 g
(4)	K ₂ HPO ₄	1,5 g
(5)	KH ₂ PO ₄	3,5
(6)	CaCl ₂ .2H ₂ O	0,5 g
Micronutriente		
(7)	ZnSO ₄ .7H ₂ O	1,764 g
	MnCl ₂ .4H ₂ O	0,288 g
	MoO ₃	0,142 g
	CuSO ₄ .5H ₂ O	0,314 g
	Ca (NO ₃) ₂ .6H ₂ O	0,098 g
(8)	H ₃ BO ₄	2,28 g
(9)	Na ₂ EDTA	10 g
	KOH	6,2 g
(10)	FeSO ₄ .7H ₂ O	0,996 g
	H ₂ SO ₄	0,2 mL

El medio se prepara con 10 mL de cada solución de macronutrientes y 1 mL de cada solución de micronutrientes en 1 L de agua destilada. El pH se ajusta a 0,6-0,8 con solución de NaOH 0,1 M.

Tabla III: Condiciones utilizadas para los ensayos de toxicidad.

Tipo de experimento	Estático
Temperatura	22°C±2°C
Calidad de luz	Blanco y frío
Intensidad de luz	80 $\mu\text{mol fotones m}^{-2} \text{s}^{-1}$
Fotoperiodo	Iluminación continua
Frasco de ensayo	Erlenmeyer de 125 mL
Volumen de ensayo	20 mL
Inóculo	0,1 - 0,2 mL
Densidad celular inicial	100.000 células/mL
N° réplicas	2
Agitación	80 rpm
Medio de crecimiento	BBM
Duración del test	72 hs
Variable respuesta	Densidad Celular estimada por turbidez a 750 nm
Resultados expresados en	%I, CE ₂₀ , CE ₅₀ y CE ₈₀