



UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales
Departamento de Biodiversidad y Biología Experimental

**Evaluación del efecto del Diclofenac sobre una cepa
tolerante de *Scenedesmus acutus* (Chlorophyta)**

Tesis de Licenciatura en Ciencias Biológicas

Paloma Messutti

Directora: Dra. Ángela Beatriz Juárez

Lugar de trabajo: DBBE FCEyN-UBA

Marzo 2024

Índice

Resumen	4
Abstract	6
Agradecimientos	8
Glosario	11
Introducción	13
Agua: un recurso esencial pero contaminado	13
Contaminantes de Preocupación Emergente (CPE)	16
Compuestos Farmacéuticos	17
Diclofenac	18
Efectos del Diclofenac en animales	19
Impacto del Diclofenac sobre fitoplancton	21
Microalgas como modelo en estudio de contaminación: Bioensayos algales	21
Parámetros indicadores de toxicidad en bioensayos algales	22
Objetivos e Hipótesis	25
Objetivo general	25
Objetivos específicos	25
Hipótesis	25
Materiales y Métodos	26
Cepas modelo y su mantenimiento	26
Descripción de las cepas	27
Bioensayos de Toxicidad	29
Crecimiento de los cultivos	30
Contenido de Pigmentos	31
Morfología celular	31

Volumen celular (Biovolumen)	32
Parámetros de estrés oxidativo	33
Niveles de peroxidación lipídica	33
Antioxidantes	34
Ácido Ascórbico	34
Fenoles	34
Análisis estadístico	35
Resultados	35
Morfología	35
Crecimiento de cultivos	37
Biovolumen	37
Niveles de pigmentos	38
Parámetros de estrés oxidativo	39
Niveles de peroxidación lipídica	39
Niveles de ácido ascórbico	40
Contenido de Fenoles	41
Discusión	42
Conclusiones	51
Referencias bibliográficas	52

Resumen

Evaluación del efecto del Diclofenac sobre una cepa tolerante de *Scenedesmus acutus* (Chlorophyta)

En regiones densamente pobladas como el Área Metropolitana de Buenos Aires (AMBA), se generan grandes cantidades de residuos domiciliarios, hospitalarios e industriales, los cuales ingresan a los sistemas acuáticos como mezclas complejas que contienen una alta proporción de los denominados “contaminantes de preocupación emergente” (CPE). El diclofenac es uno de los antiinflamatorios no esteroideos de mayor uso a nivel medicinal y veterinario en el mundo. Debido a su uso masivo y a su resistencia al tratamiento en las estaciones depuradoras de aguas residuales (EDAR), este fármaco es usualmente encontrado en las aguas residuales y superficiales de nuestro país, teniendo potenciales efectos tóxicos sobre la biota de estos ecosistemas e impactando sobre organismos de comunidades clave como la fitoplanctónica.

En esta tesis se evaluó la toxicidad del diclofenac sobre una cepa autóctona de *Scenedesmus acutus* (Chlorophyta) aislada del río Matanza-Riachuelo en comparación con una cepa estándar de colección internacional de *Raphidocelis subcapitata* (Chlorophyta). Se analizaron parámetros de toxicidad, así como parámetros de daño oxidativo y de respuesta antioxidante y su relación con la sensibilidad/tolerancia de cada cepa al fármaco.

Las dos cepas fueron tratadas con concentraciones crecientes de diclofenac sódico Sigma (0 a 75 mg diclofenac/L para *S. acutus* y 0 a 10 mg diclofenac/L para *R. subcapitata*). Luego de 96 h de exposición, en ambas cepas se evaluó: el crecimiento de los cultivos, la concentración inhibitoria 50 (CI50), el biovolumen, la morfología celular y el contenido de clorofila. Además, se evaluaron los siguientes parámetros de estrés oxidativo: niveles de peroxidación lipídica (como indicador de daño oxidativo) y niveles de ácido ascórbico, compuestos fenólicos y carotenos (como defensas antioxidantes no enzimáticas).

El diclofenac provocó una disminución del crecimiento de ambas cepas, la cual resultó estadísticamente significativa con respecto al control en las concentraciones más altas. La CI50 para *Scenedesmus acutus* fue de 64,62 mg diclofenac/L y para *R. subcapitata* de 7,34 mg diclofenac/L, estableciéndose a la cepa de *S. acutus* como la más tolerante y a la de *R. subcapitata* como la más susceptible. El tratamiento con diclofenac produjo variación en el contenido de clorofila por célula, aumento del volumen celular y alteraciones morfológicas en las dos cepas, detectándose principalmente ensanchamiento y acortamiento celular, y aparición de formas teratológicas. Los resultados obtenidos del análisis de parámetros de estrés oxidativo

indicarían que este proceso participaría del mecanismo de acción del diclofenac sobre las microalgas analizadas. En ambas cepas se observó un aumento de los niveles de peroxidación lipídica, que resultaron estadísticamente significativos en la cepa de *S. acutus* tratada con las concentraciones más altas de diclofenac. A su vez, ambas cepas mostraron un aumento significativo de las defensas antioxidantes (ácido ascórbico, fenoles y carotenos), siendo los niveles alcanzados de ácido ascórbico y fenoles en *S. acutus* mucho mayores que los alcanzados en *R. subcapitata* (161 veces y 1,5 veces mayores, respectivamente).

Los resultados mostraron que el diclofenac, en los rangos de concentraciones ensayados, tiene efectos nocivos sobre una microalga autóctona (*S. acutus*) y sobre una microalga no autóctona (*R. subcapitata*).

Abstract

Evaluation of the Effect of Diclofenac on a Tolerant Strain of *Scenedesmus acutus* (Chlorophyta)

In densely populated regions such as the Area Metropolitana de Buenos Aires (AMBA), large quantities of domestic, hospital, and industrial waste are generated, entering aquatic systems as complex mixtures containing a high proportion of so-called "contaminants of emerging concern" (CECs). diclofenac is one of the most widely used non-steroidal anti-inflammatory drugs in both medicinal and veterinary fields globally. Due to its extensive use and resistance to treatment in wastewater treatment plants, this pharmaceutical is commonly found in the wastewater and surface waters of our country, potentially exerting toxic effects on the biota of these ecosystems and impacting organisms of key communities, such as phytoplankton.

This thesis assessed the toxicity of diclofenac on a native strain of *Scenedesmus acutus* (Chlorophyta) isolated from the Matanza-Riachuelo river, comparing it with a standard strain from international collection, *Raphidocelis subcapitata* (Chlorophyta). Toxicity parameters, as well as oxidative damage and antioxidant response parameters, were analyzed in relation to the sensitivity/tolerance of each strain to the drug.

Both strains were exposed to increasing concentrations of diclofenac sodium Sigma (0 to 75 mg diclofenac/L for *S. acutus* and 0 to 10 mg diclofenac/L for *R. subcapitata*). After 96 hours of exposure, the following parameters were evaluated in both strains: culture growth, inhibitory concentration 50 (IC50), biovolume, cell morphology, and chlorophyll content. Additionally, oxidative stress parameters were assessed, including levels of lipid peroxidation (as oxidative damage indicator) and levels of ascorbic acid, phenolic compounds, and carotenoids (non-enzymatic antioxidant defenses).

diclofenac caused a decrease in the growth of both strains, which was statistically significant compared to the control at the higher concentrations. The IC50 for *Scenedesmus acutus* was 64.62 mg diclofenac/L, and for *R. subcapitata* it was 7.34 mg diclofenac/L, establishing *S. acutus* as the most tolerant strain and *R. subcapitata* as the most susceptible. diclofenac treatment led to variations in chlorophyll content per cell, increased cell volume, and morphological alterations in both strains, primarily characterized by cell widening, shortening, and the appearance of teratological forms.

Results from the analysis of oxidative stress parameters suggested that this process may be involved in the mechanism of action of diclofenac on the analyzed microalgae. Both strains showed an increase in lipid peroxidation levels, statistically significant in the *S. acutus* strain

treated with the higher concentrations of diclofenac. Moreover, both strains exhibited a significant increase in antioxidant defenses (ascorbic acid, phenols, and carotenoids), with levels of ascorbic acid and phenols in *S. acutus* much higher than those in *R. subcapitata* (161 times and 1.5 times higher, respectively).

The results demonstrated that diclofenac, within the tested concentration ranges, has detrimental effects on a native microalga (*S. acutus*) and a non-native microalga (*R. subcapitata*).

Agradecimientos

Fue en el año 2015 cuando ingresé a la carrera y comencé este hermoso viaje en el estudio de las ciencias biológicas. En todos mis años de cursada dediqué mi tiempo y mi energía en aprender sobre los seres vivos, sobre su diversidad, su maravillosa organización y su intrigante complejidad. Pero en mi transitar por la Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, aprendí sobre cuestiones que van más allá de lo meramente académico: aprendí sobre perseverancia, compromiso y pasión. Y aún más, aprendí acerca del valor de la amistad y el amor verdadero. Por eso, en este último gran paso en mi recorrido por la Licenciatura en Cs. Biológicas, quisiera agradecer a todas las personas que me acompañaron durante este camino, y que resultaron fundamentales para que hoy pueda llegar a este momento.

A toda mi familia, por alentarme siempre a que realice esta carrera universitaria y felicitarme cada vez que les contaba que había aprobado los exámenes. Y en particular quisiera agradecer:

A mi mamá Claudia y a mi papá Guillermo, por darme la vida y por enseñarme los motivos para apreciarla y cuidarla, por inculcarme el valor sobre la educación y la cultura del trabajo, y por ayudarme con todo lo que estuvo al alcance de sus manos, para que mi transitar por esta carrera sea el mejor posible. Sin importar mi edad, como hija, mi mayor logro siempre va a ser que ustedes estén orgullosos de mí.

A mis hermanos mayores, Fernando y Gustavo, por acompañarme incondicionalmente desde el día que nací, por quererme tal cual soy, y por demostrarme que sin importar que tan arduo y complejo pueda ser el camino, siempre hay esperanza si obramos desde nuestro corazón.

A Vicente, por confiar siempre en mí y por enseñarme que “así somos los universitarios”.

A mi madrina Patricia, por ser uno de los pilares más importantes que tuve durante todos estos años, por permitirme ser parte de su hogar y vivir momentos que brillaran por siempre más que el oro y los diamantes.

A mi prima Jazmín, por ser mi primera amiga, por enseñarme a nadar y por ser como un faro en mi vida, el cual con su luz siempre va a llevarme a buen puerto.

A mis primos Lisandro y Emir, por ser como hermanos para mí, por todos los días compartidos en Ramos Mejía y por quererme siempre.

A mi novio Pablo, por su amor tan grande, por haberme acompañado durante todo este último trayecto de mi carrera, por haberme hecho parte de su mundo, y por haberme ayudado a crecer como persona y transformar para siempre mi concepción sobre la vida y sobre mí misma.

A mis amistades de la facultad, con quienes viví momentos hermosos (interminables jornadas de estudio, laboratorios, almuerzos en el pastito, salidas de campo, fiestas, y demás), siendo quienes me vieron crecer como persona y transformarme en la Paloma que hoy soy. Tener amistades es algo lindo, pero tener amistades dentro de la FCEyN es algo que no tiene precio ni comparación.

A mi amiga Carla, por ser tan mágica y fiel, por haber sido testigo de mi mayor metamorfosis en esta vida, por dejarme siempre en claro el orgullo que siente por mí, y por demostrarme que el amor de la amistad verdadera no conoce de fronteras.

A mis amigas Cande y Dai, por haber estado a mi lado todos estos años, por mostrarme que cuando el cariño es real el tiempo no puede disolver nada, y por ser de las amistades más lindas y sanas que la vida me pudo dar.

A la beca de trabajo otorgada por el Centro de Estudiantes de la FCEyN (CECEN), por darme la posibilidad de trabajar en “el barcito” de la facultad, y permitirme tener mis ingresos económicos mientras realicé mi carrera.

A mi directora de tesis la Dra. Ángela Juárez, por haber sido mi mentora durante todo el desarrollo de mi tesis, por su calidez humana y su excelencia como profesional. Y al grupo de trabajo del laboratorio de Biología de Protistas, las Dra. Verónica Viu y Dra. Silvina Rosa, por acompañar todo el proceso, ofrecer su ayuda siempre que lo necesité, y generar un ambiente de trabajo muy agradable.

A la Universidad de Buenos Aires por otorgarme la Beca Estímulo que me permitió desarrollar este trabajo de investigación y por proveer los fondos para financiar los proyectos UBACyT 20020170100359BA “Evaluación del impacto de la contaminación en áreas urbanas y agrícola-ganaderas de Buenos Aires” (Directora A. Juárez, Co-directora A. Magdaleno), y

UBACyT 20020220200048BA “Impacto de contaminantes de origen agrícola y urbano industrial: evaluación del efecto en distintos modelos biológicos” (Directora A. Juárez, Co-directora G. Chaufan).

Al CONICET por proveer los fondos para financiar el proyecto PUE22920180100006CO “Desarrollo experimental de una cadena trófica modelo para evaluar los efectos de la biomagnificación de contaminantes ambientales” (Director E. Rodríguez).

Glosario

ACV: Accidente cerebrovascular

AINEs: Antiinflamatorios no esteroideos AMBA: Área Metropolitana de Buenos Aires

ANOVA: Análisis de la varianza

APX: Ascorbato Peroxidasa

BBM: Medio basal de Bold

Chl *a*: Clorofila *a*

Chl *b*: Clorofila *b*

CI10: Concentración Inhibitoria 10. Concentración del compuesto que inhibe el crecimiento de los cultivos en un 10% con respecto al control.

CI20: Concentración Inhibitoria 20. Concentración del compuesto que inhibe el crecimiento de los cultivos en un 20% con respecto al control.

CI50: Concentración Inhibitoria 50. Concentración del compuesto que inhibe el crecimiento de los cultivos en un 50% con respecto al control.

CI90: Concentración Inhibitoria 90. Concentración del compuesto que inhibe el crecimiento de los cultivos en un 90% con respecto al control.

CPE: Contaminante de preocupación emergente

EDAR: Estaciones depuradoras de aguas residuales.

ERO: especies reactivas de oxígeno

GSH: Glutation Reducido

LOEC (por sus siglas en inglés): Lowest observed effect concentration. Concentración más baja de un tóxico empleado en un bioensayo, que produce efectos estadísticamente significativos sobre la variable dependiente analizada.

MDA: malondialdeído

NOEC (por sus siglas en inglés): No observed effect concentration. Concentración más alta de un tóxico empleado en un bioensayo, que no produce efectos estadísticamente significativos sobre la variable dependiente analizada.

OECD: Organisation for Economic Co-operation and Development (Organización para la cooperación y el desarrollo económico).

ONU: Organización de las Naciones Unidas

SOD: Superóxido Dismutasa

TBARS (por sus siglas en inglés): Thiobarbituric Acid Reactive Substances (Sustancias Reactivas al Ácido Tiobarbitúrico).

USEPA: United State Environmental Protection Agency (Agencia de protección ambiental de los Estados Unidos)

Introducción

Agua: un recurso esencial pero contaminado

El agua es un recurso esencial para el sostenimiento de la vida en el planeta, así como para el desarrollo de la vida humana. En 2010, la Organización de las Naciones Unidas (ONU) declaró el acceso al agua potable y al saneamiento como derecho humano esencial, pues resulta fundamental para el ejercicio de todos los demás derechos humanos como la alimentación, la salud, la educación, el trabajo y el ambiente sano. Sin embargo, en la actualidad, más de 1.200 millones de personas en el mundo carecen de acceso al agua potable, y cerca de 2.100 millones no cuentan con servicios de saneamiento (Aysa, 2018). Nuestro planeta contiene aproximadamente 1.386 millones de km³ de agua, cubriendo alrededor de un 70% de su superficie. El 97% del agua se encuentra presente en océanos, mares y bahías, siendo no apta para el consumo humano directo ni para el desarrollo de la vida de muchos organismos. El restante 3% corresponde a agua dulce y se encuentra distribuido en diversos reservorios, donde el 2,04% corresponde a aguas congeladas presentes en mantos de hielo continental, glaciares, nieves permanentes y permafrost. El restante 0,96% corresponde al agua presente en cuencas subterráneas, humedales, lagos, lagunas, ríos, arroyos, humedad del suelo, humedad de la atmósfera, y dentro de los organismos (agua biológica) (Gleick, 1993). El agua dulce resulta ser un recurso esencial que escasea y que, a causa del acelerado desarrollo humano y económico, sufre un gran deterioro. Actualmente existe una conciencia general de que las actividades humanas provocan alteraciones en el ambiente, afectando a los organismos de los distintos ecosistemas y finalmente produciendo impactos sobre la salud humana. La Organización Mundial de la Salud muestra que la contaminación del agua es la principal causa de muertes y enfermedades en el mundo, con valores globales que superan las catorce mil personas cada día (Fassiano et al., 2013).

La expansión urbana, la agricultura, la ganadería y la industria, generan distintos contaminantes que usualmente ingresan a los sistemas acuáticos (Barceló y López, 2008, Llorca et al., 2017, OECD 2012, Petrie et al., 2015). Debido al uso inadecuado que se le otorga como medio receptor de desechos, durante décadas han sido vertidas en el medio acuático toneladas de sustancias de diversa naturaleza y origen, tanto sustancias orgánicas como inorgánicas e incluso biológicamente activas, obviándose los potenciales efectos sobre el ecosistema acuático y sobre las comunidades biológicas que allí habitan. Junto al alarmante problema de la contaminación del agua dulce, se presenta el problema de su escasez, el cual se ve acentuado en un contexto de cambio climático y desertificación el cual se encuentra atravesando nuestro

planeta en la actualidad (Barceló y López, 2008). Además, debido al uso creciente de fertilizantes en zonas agrícola-ganaderas, en las últimas décadas se observa una tendencia hacia la eutrofización de muchos cuerpos de agua, lo cual promueve el desarrollo de floraciones de cianobacterias con potenciales efectos tóxicos. Esto afecta la biota acuática, disminuye la disponibilidad de agua potable para las poblaciones humanas y tiene graves repercusiones sobre la salud pública (Roset et al., 2001, Wurtsbaugh et al., 2019).

El agua se mantiene en constante movimiento entre diversos reservorios (atmósfera, océanos, ríos, lagos, cuencas subterráneas, glaciares, etc.), movilizada por la fuerza de la gravedad y la presión de vapor inducida por la radiación solar, atravesando diversos procesos que comprenden el ciclo del agua (Figura 1).

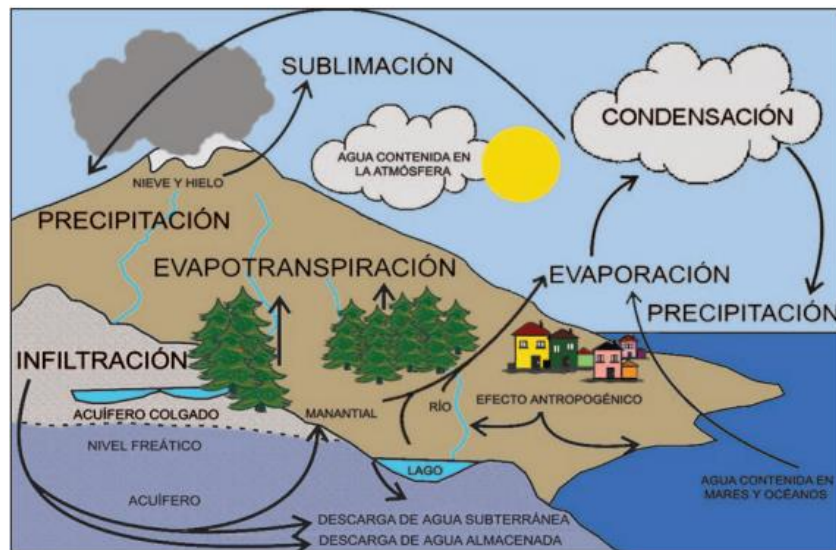


Figura 1. Esquema convencional del ciclo del agua. Tomado de De Miguel et al. (2019).

En el transcurso de dicho ciclo natural la calidad del agua puede verse alterada por causas antrópicas ya que, dentro de los distintos compartimentos, esta confluye con elementos o sustancias que son producto de las diversas actividades humanas (residuos orgánicos e inorgánicos), resultando así alterada su condición y viéndose afectados parámetros como el oxígeno disuelto, pH, turbidez, material en suspensión, demanda química y bioquímica de oxígeno, carga de nutrientes, etc. Algunas de las principales fuentes de contaminación del medio acuático son las aguas residuales o aguas servidas provenientes de sitios industriales y urbanizados, que incluyen las aguas provenientes de domicilios particulares, hospitales e industrias. Todas ellas determinan el ingreso de compuestos considerados dentro de los

denominados “de preocupación emergente”, como lo son los compuestos farmacéuticos y los productos de higiene personal, entre otros. Una fracción de las aguas contaminadas son tratadas en las estaciones depuradoras de aguas residuales (EDAR) (AySA, 2018) atravesando una serie de filtros físicos y tratamientos químico-biológicos en las plantas potabilizadoras que las vuelven aptas para el consumo humano (Figura 2). Sin embargo, una gran parte del agua contaminada no recibe ningún tipo de tratamiento, aumentando el deterioro de su calidad en los ambientes naturales, y generando alteraciones en los ciclos vitales de la flora y fauna e, inclusive, afectando la salud y la calidad de vida humana (Barceló y López, 2008, Moreno-Ortiz et al., 2013). Además, diversas sustancias (como los compuestos farmacéuticos) no son eficientemente tratadas en las EDAR, y tienden a persistir en el agua tras atravesar dichas plantas potabilizadoras (García-Estañ Marín, 2019). Por otro lado, se encuentran las aguas residuales de origen agrícola-ganadero, las cuales suelen encontrarse cargadas de fertilizantes y agrotóxicos que llegan por fenómenos de percolación y escorrentía hacia los sistemas acuáticos (aguas subterráneas, arroyos, ríos, lagunas, lagos, océano) impactando en la estructura y el funcionamiento natural de tales sistemas (Aparicio et al., 2017).

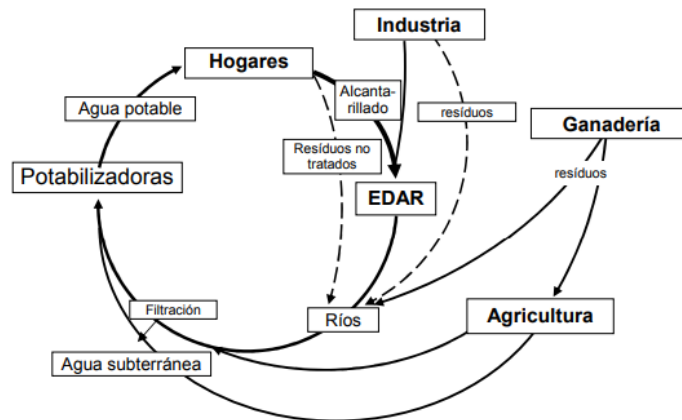


Figura 2. Principales fuentes de contaminación de los sistemas acuáticos. EDAR: Estación depuradora de aguas residuales. Tomado de Barceló y López (2008).

Contaminantes de Preocupación Emergente (CPE)

En regiones densamente pobladas como el Área Metropolitana de Buenos Aires (AMBA), se generan grandes cantidades de residuos domiciliarios, hospitalarios e industriales (PNUD, 2009), los cuales ingresan a los sistemas acuáticos como mezclas complejas que contienen una alta proporción de los catalogados como “contaminantes emergentes y/o de preocupación emergente” (CPE). Dichos CPE pueden definirse como contaminantes previamente desconocidos o no reconocidos como tales y contaminantes cuya presencia en el medioambiente no es necesariamente novedosa, pero sí la preocupación por sus posibles consecuencias. Los CPE resultan ser sustancias ampliamente distribuidas en los recursos hídricos, pero de las cuales se poseen escasos o nulos datos para poder determinar su riesgo sobre el ambiente y la salud pública, y así establecer una adecuada regulación (Barceló y López, 2008, Llorca et al., 2017, OECD, 2012, Petrie et al., 2015). Los CPE incluyen sustancias que poseen actividad biológica y, por lo tanto, pueden tener efectos tóxicos en los organismos acuáticos. Estos compuestos poseen diversos orígenes (industrial, agropecuario, medicinal, cosmética, higiene personal, etc.) y diversa naturaleza química, incluyendo tinturas, surfactantes, retardantes de llama bromados, cloroalcanos, compuestos perfluorados, pesticidas y productos farmacéuticos (antidepresivos, compuestos hormonales, antiparasitarios, antibióticos, analgésicos, antiinflamatorios, drogas recreacionales y de abuso, etc.), entre otros. Los contaminantes, una vez descargados al medio acuático, circulan física y biológicamente por un proceso de transporte que los traslada a diversos sistemas acuáticos a través de las corrientes o a través de la incorporación en organismos migratorios (Buriticá, 2019) sufriendo, además, procesos de dilución y dispersión que favorecen la disipación de sus efectos negativos. Tanto su origen como sus usos específicos, el destino que sufren, las técnicas utilizadas para su análisis, los niveles presentes en el ambiente y sus posibles efectos nocivos, son áreas de estudio que en las últimas décadas se han impulsado, y por ello es necesario fortalecer las investigaciones al respecto (Arman et al., 2021, Barceló y López, 2008). Otro aspecto destacable de los CPE es que, debido a su elevada producción y consumo, su ingreso al medioambiente resulta ser constante por lo que, aún en caso de no ser compuestos persistentes, pueden estar presentes y generar efectos adversos (Petrovic et al., 2003).

Compuestos Farmacéuticos

Un grupo de sustancias que en los últimos años ha generado gran preocupación a nivel mundial y gran interés en el ámbito científico, es el de los compuestos farmacéuticos (Elorriaga et al., 2013, Khan et al., 2020). Dentro del gran listado de CPE, se puede indicar que los fármacos son el grupo de contaminantes emergentes con mayor presencia en el medio acuático, tanto en aguas superficiales como en sedimentos (Khan et al., 2020, Oropesa et al., 2017) (Figura 3). La palabra fármaco es sinónimo de medicamento, palabra que según la RAE deriva del latín *medicamentum* y corresponde a aquella sustancia que, administrada interior o exteriormente a un animal, sirve para prevenir, curar o aliviar la enfermedad o corregir y reparar las secuelas de ésta. A partir de su etimología griega, la palabra fármaco deriva de *Phármakon*, el cual corresponde a un término polisémico que significa tanto “sustancia curativa” como “veneno”. El médico renacentista Paracelso (1493-1541) afirmaba: “La dosis hace al veneno” (Gianuzzi et al., 2018). Los compuestos farmacéuticos incluyen distintas familias terapéuticas tales como analgésicos, antiinflamatorios no esteroideos (AINEs), anestésicos, broncodilatadores, antihistamínicos, antidepresivos y ansiolíticos, entre otros (Oropesa et al., 2017) (Figura 3).

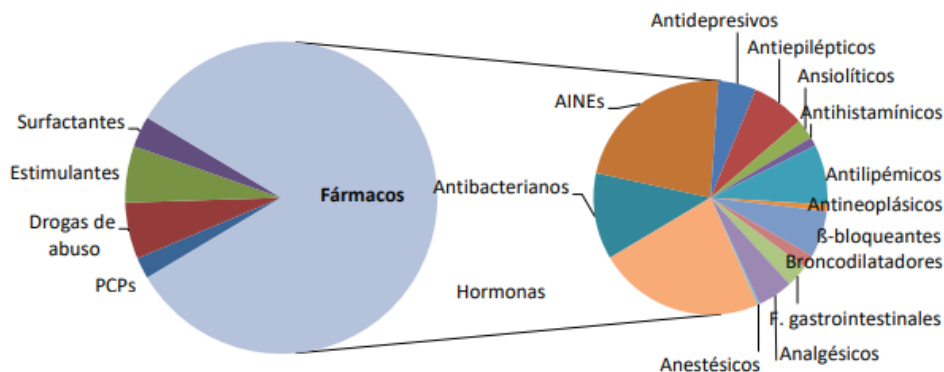


Figura 3: Representación de los porcentajes relativos de los distintos grupos de CPE (contaminantes de preocupación emergente) detectados en aguas superficiales. Modificado de Oropesa et al., 2017.

A partir de la segunda mitad del siglo XX los compuestos farmacéuticos de origen sintético han tenido un papel fundamental en la salud y calidad de vida de las poblaciones humanas e incluso en veterinaria, por lo que su fabricación y consumo se ha incrementado desde entonces. En 1970, se reportó por primera vez la presencia de medicamentos de origen sintético en el medio

ambiente, tanto terrestre como acuático, pero esto no recibió gran atención por parte de la comunidad científica (Moreno-Ortiz et al., 2013). En las últimas décadas se ha reconocido tanto a la presencia como al destino de los compuestos farmacéuticos en los ecosistemas acuáticos como uno de los problemas emergentes dentro de los estudios de las ciencias biológicas y ambientales (Heberer, 2002). Si bien los compuestos farmacéuticos están diseñados para tener efectos biológicos específicos en humanos, en muchos casos estos compuestos pueden alterar rutas metabólicas de organismos “no blanco” (Gil Arroyo, 2015). Los compuestos farmacéuticos, al ser consumidos y parcialmente metabolizados en el organismo, pueden ser excretados junto a la orina y las heces, tanto en su forma química activa original como en forma de metabolitos secundarios (Ankley et al., 2007). Dichos compuestos tienden a persistir tras su paso por las plantas de tratamiento de aguas residuales, ingresando así a los ambientes acuáticos a través de los efluentes cloacales y convirtiéndose en agentes contaminantes (Heberer, 2002, Moreno-Ortiz et al., 2013). La introducción constante de compuestos farmacéuticos al medio ambiente es una potencial amenaza para los organismos, para el ecosistema en su totalidad, e incluso puede serlo para los seres humanos (Thomas y Hilton, 2004). Se han registrado alrededor de 200 fármacos diferentes, en concentraciones de $\mu\text{g/L}$ en distintos ríos del mundo, así como en afluentes y efluentes de aguas residuales e incluso en aguas superficiales ubicadas aguas abajo de plantas de tratamiento municipales (Heberer, 2002, Hughes et al., 2013). El diclofenac resulta ser uno de los analgésicos frecuentemente detectado en sistemas acuáticos (Heberer, 2002, Majewska et al., 2018) y fue incluido en la lista de sustancias prioritarias, para ser controladas y reguladas, establecida por la Directiva 2013/39/UE del Parlamento Europeo. En Argentina existe escasa información sobre la presencia de compuestos farmacéuticos en ambientes acuáticos (Valdés et al., 2014 y 2021). Sin embargo, se ha informado la presencia de algunos fármacos, incluyendo los analgésicos Ibuprofeno ($13 \mu\text{g/L}$) y diclofenac ($0,03 - 1,2 \mu\text{g/L}$) en efluentes avícolas y en aguas residuales y superficiales de zonas urbanizadas de las provincias de Córdoba y Buenos Aires (Elorriaga et al., 2013a y b, Teglia et al., 2017, Valdés et al., 2014 y 2021).

Diclofenac

El Diclofenac (Figura 4) es un fármaco derivado del ácido fenilacético, miembro de la familia de los antiinflamatorios no esteroideos (AINEs). Actúa como inhibidor relativamente selectivo de la ciclooxigenasa, enzima que, en el hombre, permite producir las denominadas prostaglandinas (sustancias similares a hormonas, las cuales regulan la presión arterial y la contracción del músculo liso). Gracias a su mecanismo de acción, el diclofenac está indicado como analgésico y

antiinflamatorio, y suele utilizarse para reducir los cólicos menstruales, los dolores musculares tras intensa actividad física y tratar síntomas de artritis reumatoidea y dolores en post-operatorios, entre otros. Además, su utilización se extiende al uso veterinario, aplicándose usualmente en equinos, bovinos, ovinos y caprinos. Su fórmula química es $C_{14}H_{11}NCl_2O_2$, su peso molecular es 296,148 g/mol y su nomenclatura IUPAC es ácido 2-(2-((2,6 diclorofenyl)amino)fenil)acético. Su metabolismo es hepático y su excreción es urinaria y biliar, principalmente en forma de metabolitos. En la orina, tan solo el 1% es excretado en forma de diclofenac inalterado, mientras que en su mayoría es eliminado en forma de metabolitos conjugados. La dosis máxima recomendada en humanos es de 200 mg/día.

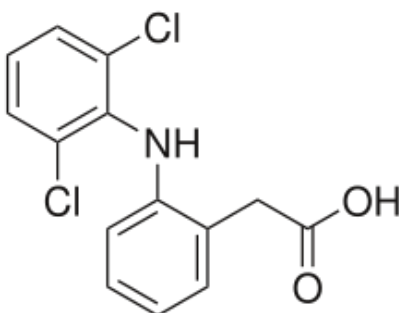


Figura 4. Estructura química en 2D del Diclofenac ácido: 2-(2-((2,6diclorofenyl)amino)fenil)acético.

Entre sus efectos secundarios, se ha encontrado que el uso de este fármaco puede producir eventos cardiovasculares como ACV isquémicos, insuficiencia cardíaca, infarto de miocardio, además de sangrado gástrico y desarrollo de alergias por hipersensibilidad, entre otras. El uso del diclofenac, tanto en la medicina como en la veterinaria, es sumamente frecuente y en la actualidad se ha vuelto un hábito (Diclofenac prescribing, 2023). En las últimas décadas se ha confirmado su ubicuidad a nivel mundial en diversos compartimentos ambientales, destacando su presencia en ambientes acuáticos (Lonappan et al., 2016).

Efectos del Diclofenac en animales

Debido a su frecuencia en el medioambiente y su potencial efecto tóxico sobre los organismos, el diclofenac es un fármaco catalogado como CPE. El primer caso de toxicidad ambiental registrado para el diclofenac es el del buitre asiático de lomo blanco (*Gyps bengalensis*), un ave carroñera autóctona del subcontinente indio, la cual a partir de los años 90' viene sufriendo una

gran disminución poblacional, a causa del consumo de cadáveres de ganado con presencia de diclofenac de uso veterinario. Esa ingesta ocasionaría insuficiencia renal en las aves, conduciéndolas a la muerte. Actualmente, el buitre asiático se encuentra catalogado como en “peligro crítico de extinción” (Oaks et al., 2004).

El diclofenac es también uno de los fármacos encontrados con mayor frecuencia en las aguas superficiales y sedimentos de los ecosistemas acuáticos en todo el mundo (Blasco y Trombini, 2023, Lonappan et al., 2016, Oropesa et al., 2017), presentando un potencial de toxicidad hacia los organismos de los distintos niveles de las tramas tróficas acuáticas. Su presencia ha sido registrada en sistemas acuáticos alrededor del mundo, tal como Argentina (1,2 µg/L) (Elorriaga et al., 2013), España (18,74 µg/L) (Ginebreda et al., 2010), Brasil (759,06 µg/L) (Ferreira do Nascimento et al., 2023), etc. En las concentraciones ambientales típicamente detectadas, el fármaco podría no presentar efectos tóxicos para los organismos, aunque la exposición crónica al fármaco podría provocar efectos graves sobre la biota acuática (Lonappan et al., 2016).

Existen antecedentes de presencia de diclofenac en la biota acuática y de sus potenciales efectos tóxicos. Un estudio detectó este analgésico en concentraciones de 6 a 95 ng/mL en la bilis de dos tipos de peces (*Abramis brama*, *Rutilus rutilus*) capturados en estado silvestre en un pequeño lago aguas abajo de una EDAR en Finlandia (Brozinski et al., 2013). A su vez, un estudio realizado en el pez de agua dulce *Astyanax altiparanae*, reveló que la exposición a 3,08 mg/L de diclofenac por 96h, provocó la inhibición de las enzimas antioxidantes hepáticas superóxido dismutasa y glutatión peroxidasa de los individuos (Muñoz-Peñuela et al., 2021). De igual manera se ha reportado que el diclofenac afecta las branquias y los riñones en peces de agua dulce, lo que sugiere un posible riesgo para este tipo de poblaciones (Hoeger et al., 2005). En un estudio realizado en mejillones (*Mytilus galloprovincialis*), se analizó el efecto de una concentración ambientalmente relevante de diclofenac (250 ng/L), exponiendo los animales durante 15 días. Se confirmó que dicho fármaco induce respuestas de marcadores bioquímicos en algunos tejidos, tales como las branquias y la glándula digestiva (Gonzales-Rey y Bebianno, 2014). Un estudio en donde se evaluaron los efectos tóxicos del diclofenac sobre larvas de dos especies de anfibios de Argentina (*Trachycephalus typhonius* y *Physalaemus albonotatus*), exponiéndolas a concentraciones de 125 – 4000 µg/L mostró, para ambas especies, que se redujeron significativamente el desarrollo larvario, la tasa de crecimiento y la condición corporal de los individuos. Los individuos también mostraron varias anomalías morfológicas y alteraciones en su natación. A su vez, las concentraciones de diclofenac estudiadas produjeron un desequilibrio en determinados marcadores bioquímicos (Peltzer et al., 2019).

Impacto del Diclofenac sobre el fitoplancton

Frente al panorama actual de contaminación del medio ambiente, es preciso conocer e informar acerca del potencial riesgo al cual se exponen las comunidades biológicas de los ecosistemas acuáticos, destacando el impacto particular que sufren las regiones altamente urbanizadas. El fitoplancton es una de las primeras comunidades en responder a variaciones de la calidad de agua (McCormic et al., 1997) y cualquier impacto adverso en esa comunidad de productores primarios puede afectar a los niveles tróficos superiores, teniendo consecuencias sobre la integridad del ecosistema acuático en su totalidad (De Lorenzo et al., 2001).

Si bien existe bastante documentación sobre la toxicidad del diclofenac en animales (Santos et al., 2010), la información sobre su efecto en microalgas es escasa. Por ejemplo, se demostró que inhibe el crecimiento de *Scenedesmus vacuolatus*, *Desmodesmus subspicatus*, *Dunaliella tertiolecta* y *Chlamydomonas reinhardtii* (Cleuvers, 2004, De Lorenzo y Fleming, 2008, Majewska et al., 2018, Schmitt-Jansen et al., 2007). Por lo tanto, este contaminante puede afectar el crecimiento y supervivencia de distintas especies de microalgas en un cuerpo de agua de una determinada región. Ese impacto puede llevar a cambios en la estructura taxonómica del fitoplancton y a una disminución del alimento para los consumidores, provocando una desestabilización del ecosistema acuático. Debido a su papel fundamental en el sustento de las cadenas tróficas acuáticas y su accesible cultivo en medio líquido con nutrientes, las microalgas resultan ser importantes modelos para el estudio de la toxicidad de contaminantes acuáticos *in vivo* (Lam et al., 1999).

Microalgas como modelo en estudios de contaminación: bioensayos algales

Un tóxico es un agente natural o sintético que, según las condiciones del medio, puede producir un efecto adverso en un sistema biológico, dañando su estructura y/o función en diverso grado y finalmente produciendo la muerte. Los bioensayos de toxicidad son herramientas de diagnóstico adecuadas para determinar la concentración de un agente (producto químico, efluente, lixiviado, etc.) que produce un efecto nocivo sobre especies modelo expuestas bajo condiciones controladas. Estos ensayos también permiten estimar el riesgo que representa para los organismos y el ambiente el uso de ciertos productos de origen domiciliario, hospitalario, agrícola e industrial, así como las descargas producidas por esas actividades (De la Torre, 2001). A lo largo de los años, la comunidad científica y los distintos organismos ambientales han seleccionado especies modelo sobre la base de su nivel de organización, su ruta de exposición

y la relevancia de su función ecológica (productores, consumidores, etc.) (Magdaleno, 2004). A partir de la década de 1980, los ensayos de toxicidad en algas se han incorporado en distintas regulaciones, como en la Directiva de Valoración de Riesgo de Sustancias Industriales Nuevas y Existentes (Nyholm y Kallqvist, 1989, Nyholm y Peterson, 1997).

Las microalgas conforman la comunidad productora, lo que las convierte en componentes claves de los ecosistemas acuáticos. Además de su rol fundamental sosteniendo las tramas tróficas, ellas presentan una serie de características que determinan su importancia como modelo biológico en estudios de toxicidad y riesgo ambiental: son sensibles a la mayoría de los tóxicos (generalmente más sensibles que organismos de niveles tróficos superiores), son fáciles de manejar en cultivos de laboratorio, tienen un tiempo generacional corto y presentan rápidas respuestas fisiológicas, permitiendo evaluar los efectos en plazos cortos. Además, en los bioensayos con microalgas se mide la respuesta a nivel de población, lo cual representa una ventaja frente a los ensayos con animales como peces e invertebrados. Sobre la base de esas características, las microalgas han sido incluidas por los organismos regulatorios internacionales (USEPA, OECD, etc.) en sus normas y directivas para la evaluación de riesgo de sustancias químicas. En estas directivas, las principales especies establecidas como estándares internacionales son *Raphidocelis subcapitata* (antes *Pseudokirchneriella subcapitata* y *Selenastrum capricornutum*), *Scenedesmus subspicatus*, *Chlorella vulgaris*, *Anabaena flos-aquae*, *Skeletonema costatum* y *Navicula pelliculosa*. Y, por ejemplo, para el registro de un nuevo plaguicida, la USEPA requiere ensayos con al menos cuatro de esas especies (Magdaleno, 2004, Takara, 2022).

Parámetros indicadores de toxicidad en bioensayos algales

Las diversas sustancias tóxicas presentes en el medio pueden provocar numerosos efectos adversos a distintos niveles de la organización biológica (molecular, celular, tisular, etc.), por lo que una gran variedad de métodos ha sido desarrollada para su estudio. Los bioensayos de toxicidad representan una metodología estandarizada y reproducible, y son empleados a fin de determinar la susceptibilidad/tolerancia a las sustancias químicas y encontrar las concentraciones y la duración de la exposición que produce efectos adversos en los organismos. Los bioensayos de toxicidad acuática realizados en laboratorios se enfocan en analizar los efectos de determinado tóxico o mezcla de sustancias tóxicas, evaluando determinados parámetros indicadores de toxicidad (morfológicos, fisiológicos o bioquímicos) (Juárez, 2017).

Un parámetro frecuentemente utilizado en los bioensayos toxicológicos con microalgas es la estimación de la Inhibición del crecimiento de los cultivos. Para ello, se utilizan diferentes parámetros relacionados a la densidad de células algales de los cultivos, como el número de células alcanzado (medida directa por recuento celular) y la Absorbancia a determinadas longitudes de onda (medida indirecta). El ensayo estandarizado de Inhibición del crecimiento en algas implica la exposición del cultivo a la sustancia de ensayo durante cierto periodo (72 horas, 96 horas, etc.), y la determinación de los correspondientes porcentajes de inhibición del crecimiento respecto al control de cada una de las concentraciones de ensayo. Con estos porcentajes se calcula la Concentración Inhibitoria 50 (CI50) que corresponde a la concentración del compuesto que inhibe el crecimiento de los cultivos en un 50% con respecto al control. Además, existen otros parámetros relacionados a inhibición del crecimiento que pueden estimarse y son de interés para los organismos regulatorios: la concentración más alta que no produce efecto (NOEC, por sus siglas en inglés), la concentración más baja que produce efecto (LOEC, por sus siglas en inglés) y una serie de concentraciones inhibitorias que aumentan la información sobre los posibles efectos nocivos del tóxico (CI10, CI20, CI90) (OECD, 2011). A su vez, pueden considerarse parámetros morfológicos tales como la variación en la forma, tamaño y tipo de agregación celular, parámetros ultraestructurales como la morfología y condición de ciertas organelas, además de la determinación de pigmentos mediante espectrofotometría (clorofila *a*, *b*, carotenos), y parámetros de estrés oxidativo.

El estrés oxidativo es un estado de la célula en el cual se encuentra alterada su homeostasis de óxido-reducción, es decir su balance entre prooxidantes y antioxidantes. Este desbalance se produce a causa de una excesiva producción de especies reactivas de oxígeno (ERO) y/o de una deficiencia en los mecanismos antioxidantes, lo cual conduce a la oxidación de macromoléculas esenciales (peroxidación de lípidos, oxidación de proteínas, daño al ADN) y el consecuente daño celular (Ríos de Molina, 2003). Los principales procesos fisiológicos celulares generan ERO y en las células fotosintéticas, como es el caso de las microalgas, las principales organelas generadoras de estas moléculas son las mitocondrias y los cloroplastos, donde se forman como consecuencia del metabolismo energético oxidativo y el intenso flujo de electrones que existe en las membranas mitocondriales y tilacoidales (Asada, 1999, Kowaltowski et al., 2009).

A su vez, diversos factores ambientales como la radiación UV, anoxia, disponibilidad y tipo de nutrientes, y el ingreso dentro de las células de contaminantes tales como herbicidas, pesticidas, fármacos, toxinas, etc., pueden exacerbar la producción de ERO (iones de oxígeno como el anión superóxido, radicales libres como el radical hidroxilo y peróxidos inorgánicos y orgánicos). Ello induce una respuesta antioxidante que involucra compuestos antioxidantes

enzimáticos y no enzimáticos. Si no se logran equilibrar los niveles de prooxidantes y antioxidantes, ocurre la oxidación de macromoléculas conduciendo a un estado de estrés oxidativo. Los niveles de respuesta antioxidante pueden variar significativamente entre distintas especies de microalgas. Esa diferencia puede relacionarse con la susceptibilidad de las especies a distintos contaminantes (Lei et al., 2006). Para evaluar la inducción de estrés oxidativo en bioensayos algales se consideran parámetros de daño oxidativo tales como peroxidación lipídica. A su vez, se consideran parámetros de respuesta antioxidante a través de la determinación de la actividad de enzimas antioxidantes como la superóxido dismutasa (SOD), la catalasa y la ascorbato peroxidasa (APX). Otro tipo de parámetro considerado es el contenido de compuestos antioxidantes no enzimáticos, tales como los niveles de glutatión reducido (GSH), los niveles de ácido ascórbico, el contenido de compuestos fenólicos y el contenido de carotenos (Agrawal y Sharma, 2010, Kohen y Niska, 2002, Romero et al., 2011, Iummato et al., 2019).

Como se ha mencionado, los cuerpos de agua de áreas densamente urbanizadas están sujetos al ingreso de una compleja mezcla de contaminantes que incluye compuestos farmacéuticos, entre los cuales puede encontrarse el diclofenac. La generación de información acerca de los efectos que tienen los fármacos presentes en cuerpos de agua de Argentina sobre organismos representativos del ecosistema, puede ayudar a una mejor comprensión del impacto que ejercen sobre la biota las actividades humanas desarrolladas en dichas zonas urbanizadas. La Cuenca del Río Matanza – Riachuelo se encuentra en una de las zonas más urbanizadas, industrializadas y afectadas a nivel socio-ambiental de todo el país (ACUMAR, 2024). El fitoplancton de este río se encuentra expuesto a los contaminantes que ingresan constantemente desde sus afluentes, y las especies allí presentes podrán verse afectadas en mayor o menor grado según su sensibilidad o tolerancia. Incluso, dada la larga historia de contaminación de esta cuenca, podría esperarse que ciertas especies de microalgas que crecen en este río toleren altos niveles de contaminantes (Rai et al., 1996). Aunque actualmente no se cuenta con información de la presencia del diclofenac en el Río Matanza-Riachuelo, este fármaco es uno de los analgésicos más utilizados por la población y ha sido detectado en aguas residuales y superficiales de nuestro país (Elorriaga et al., 2013). El presente trabajo de tesis intenta constituir un aporte a las investigaciones que tiendan a esclarecer los posibles efectos nocivos de este compuesto sobre organismos que cumplen un papel clave en este ecosistema acuático (microalgas).

El análisis del efecto del diclofenac sobre una especie estándar internacional no necesariamente nos informará sobre el impacto en especies propias de un cuerpo de agua de nuestro país. Por lo tanto, en la presente tesis se aborda el análisis de su efecto sobre el

crecimiento y la morfología de una cepa de microalga aislada específicamente del Río Matanza-Riachuelo (*Scenedesmus acutus*) en comparación con la cepa estándar *Raphidocelis subcapitata* (antes *Pseudokirchneriella subcapitata* y *Selenastrum capricornutum*). Dado que hasta el momento existen escasas evaluaciones de parámetros de estrés oxidativo en microalgas autóctonas expuestas a diclofenac, también se analizan marcadores de daño oxidativo (peroxidación lipídica) y de respuesta antioxidante no enzimática, que podrían relacionarse con la tolerancia o susceptibilidad de cada cepa.

Objetivos e Hipótesis

Objetivo general

Evaluar el riesgo que implica la contaminación con diclofenac para microalgas de ambientes acuáticos argentinos, analizando la toxicidad sobre una cepa autóctona y sobre una cepa estándar internacional, así como la relación entre sensibilidad/tolerancia y respuesta al estrés oxidativo.

Objetivos específicos

1. Estudiar la toxicidad del diclofenac sobre una cepa autóctona de microalga verde (*Scenedesmus acutus*, aislada del río Matanza-Riachuelo, Buenos Aires, Argentina) y una cepa de microalga verde de colección internacional (*Raphidocelis subcapitata*, organismo “test” en normas internacionales de calidad de aguas).
2. Evaluar la susceptibilidad y tolerancia al diclofenac de las 2 cepas de microalgas, considerando diversos parámetros indicadores de toxicidad: crecimiento y CI50, morfología celular, biovolumen, contenido de pigmentos, y algunos parámetros indicadores de estrés oxidativo.
3. Correlacionar la capacidad de respuesta antioxidante de cada cepa con su susceptibilidad y tolerancia.

Hipótesis

1. El diclofenac afecta el metabolismo de la cepa autóctona de *S. acutus*, y de la cepa no autóctona de *R. subcapitata*.
2. Las dos cepas de microalgas presentan diferente susceptibilidad y tolerancia al diclofenac.
3. En la toxicidad del diclofenac están implicados procesos de estrés oxidativo.
4. Las diferencias en susceptibilidad y tolerancia de las cepas de microalgas se relacionan con su menor/mayor capacidad antioxidante.

Materiales y Métodos

Cepas modelo y su mantenimiento

Se trabajó con dos cepas axénicas de algas verdes (Chlorophyta):

- Cepa autóctona aislada del río Matanza-Riachuelo, Buenos Aires, Argentina (Colección de cultivos de algas y ciliados del Laboratorio de Biología de Protistas del Departamento de Biodiversidad y Biología Experimental): BAFC CA 13 *Scenedesmus acutus* (Chlorophyta).

- Cepa estándar recomendada por USEPA para ensayos de calidad de aguas y toxicidad (Colección de Cultivos de Algas y Protozoos, Escocia, Reino Unido): CCAP 278/4 *Raphidocelis subcapitata* (Chlorophyta). Esta cepa en particular fue inicialmente registrada y depositada como *Selenastrum capricornutum* y a lo largo de los años, mediante estudios moleculares fue transferida y re catalogada, primeramente como *Pseudokirchneriella subcapitata* y finalmente como *Raphidocelis subcapitata* (Krienitz et al., 2011).

Ambas cepas son mantenidas en forma axénica en la Colección de cultivos de algas y ciliados del Laboratorio de Biología de Protistas del Departamento de Biodiversidad y Biología Experimental (perteneciente al Centro de Recursos Genéticos de la Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad de Buenos Aires), en medio basal de Bold agarizado (BBM) (Bischoff y Bold, 1963) bajo condiciones controladas de iluminación y temperatura (Tabla 1).

Tabla 1. Composición del medio basal de Bold (BBM)

Nutrientes	Concentración (mg/L)
NaNO ₃	250
KH ₂ PO ₄	175
K ₂ HPO ₄	75
MgSO ₄	36,6
CaCl ₂	18,9
NaCl	25
EDTA	50
KOH	31
FeSO ₄	2,45
H ₃ BO ₃	11,4
ZnSO ₄	4,95
MnCl ₂	0,91
MoO ₃	0,71
CuSO ₄	0,71
Co(NO ₃) ₂	0,3

Descripción de las cepas

***Scenedesmus acutus* Meyen 1829**

Scenedesmus acutus (Sphaeroplales, Chlorophyta) se caracteriza por formar cenobios de 4 a 8 células alineadas en un plano (Figura 5). Sus células presentan forma de huso (células centrales del cenobio) o con sus extremos algo curvados hacia el exterior (células de los extremos del cenobio) y presentan un cloroplasto parietal laminar con un pirenoide.

Dimensiones celulares: (5-) 7-25 (-27) X 2-7,5 (-14) µm (Komarek y Fott, 1983).

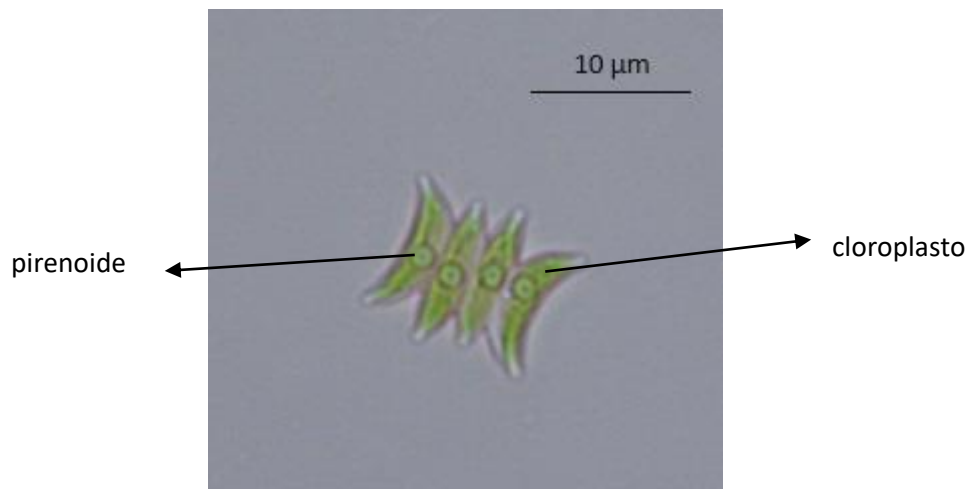


Figura 5. Cenobio de *Scenedesmus acutus* visto al microscopio óptico (1000x).

***Raphidocelis subcapitata* (Koršikov) Nygaard, Komárek, J.Kristiansen & O.M.Skulberg 1987**

Raphidocelis subcapitata (Sphaeroplales, Chlorophyta) se caracteriza por ser unicelular o formar pequeñas colonias inmersas en un mucílago muy irregular y sin estructura (Figura 6). Las células son semilunares a sigmoideas, con extremos subcapitados (ensanchados y redondeados) y presentan un cloroplasto parietal laminar con un pirenoide normalmente no distinguible al microscopio óptico.

Dimensiones celulares: 4-7 X 1-3 μm (Hindak, 1990, Krienitz et al., 2011).

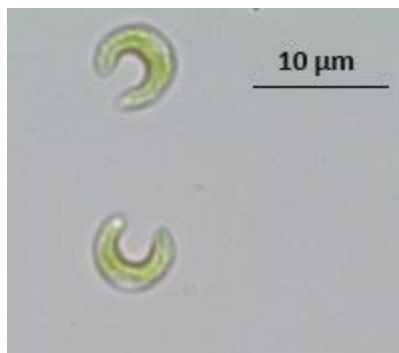


Figura 6. Células de *Raphidocelis subcapitata* vistas al microscopio óptico (1000x). **Bioensayos de Toxicidad**

Los bioensayos de toxicidad para ambas cepas se realizaron de acuerdo con las condiciones descriptas en la Tabla 2.

Tabla 2. Condiciones del test para ambas cepas.*

Tipo de Test	Estático
Temperatura	24 °C ± 1
Calidad de luz	Blanca
Intensidad de luz	80 μM fotones. $\text{cm}^{-2}.\text{s}^{-1}$
Fotoperiodo	Luz continua
Volumen de recipiente	500 ml
Volumen de cultivo	300 ml
Densidad inicial	30.000 cél/mL
Edad del inóculo	Cultivo en fase de crecimiento exponencial
Agitación	Continua
Agua de dilución	Medio de cultivo BBM líquido
Niveles del tratamiento	5 más control
Control	Medio BBM líquido (sin diclofenac)
Nº de réplicas por tratamiento	3
Duración del test	96 h

*Acorde con el protocolo USEPA (2002), con modificaciones.

Para cada cepa se realizaron bioensayos de exposición a distintas concentraciones de diclofenac. Para ello se utilizó diclofenac sódico Sigma ($\text{C}_{14}\text{H}_{10}\text{Cl}_2\text{NNaO}_2$, CAS Nº 15307-79-6), partiendo de una solución stock de 12,5 mg/mL, que fue validada mediante determinación por HPLC-UV en la Facultad de Farmacia y Bioquímica (Universidad de Buenos Aires). La cepa de *Scenedesmus acutus* fue expuesta a 15, 30, 45, 60 y 75 mg diclofenac/L y la cepa de *Raphidocelis subcapitata* a 2, 4, 6, 8 y 10 mg diclofenac/L. El rango de concentraciones utilizado para *S. acutus* se determinó a partir de la realización de bioensayos preliminares, aplicando distintos rangos y evaluando valores de la concentración inhibitoria 50 (CI50). Se consideró el rango a utilizar que contenga dos concentraciones por sobre y dos por debajo de la CI50 estimada en los bioensayos

preliminares. Para la cepa de *R. subcapitata* el rango utilizado se eligió a partir de bibliografía previa (Takara, 2022).

Tras 96 horas de incubación bajo las condiciones descritas (Tabla 2, Figura 7) se separaron distintos volúmenes de cada cultivo a fin de realizar las determinaciones de los siguientes parámetros: crecimiento de los cultivos, CI50, contenido de clorofila, biovolumen, morfología y parámetros bioquímicos relacionados a estrés oxidativo (niveles de peroxidación lipídica y niveles de los antioxidantes no enzimáticos ácido ascórbico, fenoles y carotenos).



Figura 7. Sistema de cultivo utilizado para los bioensayos.

Crecimiento de los cultivos

El crecimiento de los cultivos se determinó realizando recuento celular en cámara de Neubauer utilizando un microscopio óptico Olympus BX50. Para ello se tomaron alícuotas de 1 mL de cada cultivo y se fijaron en formol al 4%. Los recuentos se realizaron tomando como criterio un error menor o igual al 10%, considerando un α : 0.05 (Venrick, 1978), siguiendo la ecuación:

$$\epsilon\% = \frac{S_{(n-1)} / \sqrt{n \cdot t_{(n-1, \alpha 0.05), 100}}}{\text{media}}$$

Donde ϵ (%) es el error porcentual, S el desvío estándar, n el número de campos, X es la media muestral y $t(\alpha, n-1)$ el estadístico de t de Student.

A partir de los recuentos celulares se determinó, para cada cultivo, la densidad celular (N° células/mL). La CI50 se estimó utilizando el software Probitalg versión 1.4 especialmente

diseñado para variables continuas y específicamente para ensayos de toxicidad con microalgas (Puddu, 1989).

Contenido de Pigmentos

Para la determinación del contenido de los pigmentos clorofila *a* (Chl-*a*), clorofila *b* (Chl-*b*) y carotenos totales (carot), se tomaron alícuotas de 10 mL de cada cultivo y se cosecharon sus células precipitándolas por centrifugación a 10.000 rpm (10 minutos). Dichas células se resuspendieron en 0,5 mL de metanol 100% y se sonicaron a 60 Hz, aplicando 3 pulsos de 10 segundos en un homogeneizador ultrasónico Fisher Modelo 300. Luego se les completó su volumen a 1 mL con metanol 100% y se incubaron a 4 - 10 °C y oscuridad. Tras 24 h, los extractos obtenidos se centrifugaron a 10.000 rpm por 10 minutos y se leyó la absorbancia de sus sobrenadantes clarificados en un espectrofotómetro Shimadzu UV/VIS (Modelo UV-1800), a las siguientes longitudes de onda λ_1 : 665,2 nm (chl *a*), λ_2 : 652,4 nm (chl *b*) y λ_3 : 470 nm (carot). Como blanco se utilizó metanol 100%. A partir de los valores de absorbancia leídos, se realizó la estimación de la concentración de los distintos pigmentos, aplicando las siguientes ecuaciones propuestas en Lichtenthaler (1987):

$$\begin{aligned}\text{Chl } a \text{ (}\mu\text{g/mL extracto)} &= (16,72 \cdot \text{Abs } \lambda_1) - (9,16 \cdot \text{Abs } \lambda_2) \\ \text{Chl } b \text{ (}\mu\text{g/mL extracto)} &= (34,09 \cdot \text{Abs } \lambda_2) - (15,28 \cdot \text{Abs } \lambda_1) \\ \text{Carot (}\mu\text{g/mL extracto)} &= \frac{(1000 \cdot \text{Abs } \lambda_3) - (1,63 \cdot \text{Chl } a) - (104,96 \text{ Chl } b)}{221}\end{aligned}$$

Los resultados se expresaron como $\mu\text{g pigmento}/10^6$ células.

Morfología celular

La morfología celular se evaluó por microscopía óptica. Las células de los cultivos controles y de los cultivos expuestos a diclofenac fueron observadas y fotografiadas con un microscopio Leica (DM500) equipado con una cámara digital Leica modelo ICC50.

Volumen celular (Biovolumen)

Para la estimación del biovolumen, se tomaron fotografías con un microscopio Leica modelo DM 500 equipado con cámara digital Leica modelo ICC50 (aumento 1000 X) y se midieron al menos 30 células al azar de cada tratamiento y control. Utilizando el software Leica Application Suite version 1.8.0 se analizaron las imágenes, midiendo el alto (a) y ancho (b) de las células. Para cada cepa se consideró una forma geométrica apropiada, de acuerdo con los modelos y ecuaciones propuestas por Hillebrand et al. (1999). Para *R. subcapitata*, el biovolumen se estimó aplicando la ecuación: $V = \pi/6 \cdot a \cdot b^2$, considerando que la morfología celular se asemeja a un “prisma ahusado” (Figura 8). Para *S. acutus* se aplicó la ecuación: $V = \pi/6 \cdot a \cdot b^2$, considerando una morfología celular semejante a un “esferoide prolato” (Figura 9).

Prisma Ahusado

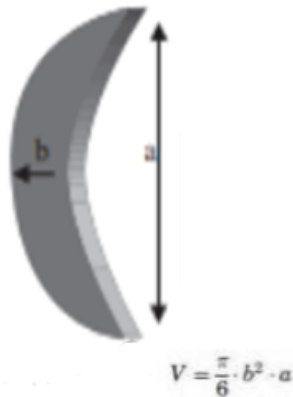


Figura 8. Geometría tipo “prisma ahusado” y ecuación para estimación del biovolumen de *R. subcapitata*. Modificado a partir de Hillebrand et al. (1999).

Esferoide prolato

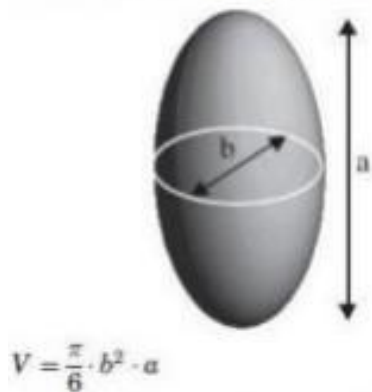


Figura 9. Geometría tipo “esferoide prolato” y ecuación para estimación del biovolumen de *S. acutus*. Modificado a partir de Hillebrand et al. (1999).

Parámetros de estrés oxidativo

Niveles de peroxidación lipídica

Para cada tratamiento se estimaron los niveles de peroxidación lipídica, midiendo el contenido de sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico (TBARS), siguiendo la técnica de Vavilin et al. (1998). Dicha técnica se basa en la reacción del ácido tiobarbitúrico (TBA) con los productos finales de la peroxidación lipídica provocada en los tratamientos, donde el malondialdehído (MDA) resulta ser uno de los compuestos mayoritarios.

La reacción entre el TBA y el MDA ocurre a pH ácido y alta temperatura, produciendo como producto un complejo de color rosado con un pico de máxima absorbancia a 532 nm. Para aplicar dicho método, se tomaron alícuotas de 40 mL de cada cultivo, y se centrifugaron a 7.000 rpm durante 15 minutos. Se retiró el sobrenadante y se agregó 1 mL de agua destilada para resuspender las células del *pellet*. Esta suspensión se fraccionó en dos submuestras de 0,5 mL cada una, realizándose una segunda centrifugación y descarte del sobrenadante. Al *pellet* obtenido de cada submuestra se le agregó 1 mL de reactivo (ácido tricloroacético 4% más BHT 1 mM) conteniendo 3 mg/mL de TBA (TBA+) o 1 mL de reactivo sin TBA (TBA-), respectivamente. Las muestras se llevaron a baño maría por 45 minutos, y luego se dejaron enfriar en hielo por 10 minutos. Se realizó una última centrifugación a 10.000 rpm por 10 minutos y luego se midieron las absorbancias de los sobrenadantes a 532 nm (máximo de absorbancia del complejo formado por TBA y MDA), 440 nm y 600 nm (interferencia de azúcares y pigmentos) en un espectrofotómetro Shimadzu UV/VIS (Modelo UV-1800). El contenido de TBARS se calculó como equivalentes de MDA (coeficiente de extinción del complejo MDA-TBA: $0.157 \mu\text{M}^{-1} \text{cm}^{-1}$) según las ecuaciones propuestas por Hodges et al. (1999) y se expresaron como nmoles de TBARS/ 10^6 células:

$$A = [(\text{Abs } 532 \text{ nm (TBA +)} - \text{Abs } 600 \text{ nm (TBA +)}) - \text{Abs } 532 \text{ nm (TBA -)} - \text{Abs } 600 \text{ nm (TBA)}]$$

$$B = [\text{Abs } 440 \text{ nm (TBA +)} - \text{Abs } 600 \text{ nm (TBA +)}] * 0,057$$

Abs (TBA+): Absorbancia a 440, 532 y 600 nm de la muestra conteniendo el reactivo con TBA.

Abs (TBA-): Absorbancia a 440, 532 y 600 nm de la muestra conteniendo el reactivo sin TBA.

$$\underline{[\text{MDA}] \text{ en nmol/ mL cultivo} = [(A-B) / 0.157] \cdot \text{Volumen de reacción}}$$

$$\text{Vol alícuota de cultivo}$$

Antioxidantes

Ácido ascórbico

La determinación del contenido de ácido ascórbico se realizó de acuerdo con el método propuesto por Okamura (1980). Este método se basa en la reducción del Fe^{3+} a Fe^{2+} en presencia de ácido ascórbico, y la reacción del Fe^{2+} con 2,2'-bipiridilo para dar como producto final un complejo de color rojizo, el cual tiene un pico de máxima absorbancia a 525 nm.

Se cosecharon las células provenientes de alícuotas de 40 mL de cada cultivo, por centrifugación a 7.000 rpm (15 minutos). El *pellet* obtenido se resuspendió en 600 μL de buffer fosfato de potasio 0,134 M pH 6,5 conteniendo EDTA 0,1 mM y se sonicó aplicando 7 pulsos a 60 Hz (15 segundos cada uno). Luego de una centrifugación a 11.000 rpm (10 min), se tomó una alícuota de 200 μL del sobrenadante, y se le agregaron 200 μL de agua destilada, 400 μL de TCA 10 % (p/v), 400 μL de H_3PO_4 42,5 % (v/v), 400 μL de 2,2' bipiridilo 4 % (p/v) en etanol 70 % (v/v) y 200 μL de FeCl_3 3 % (p/v). Se incubó a 37 °C por 1 hora, se centrifugó a 11.000 rpm (10 minutos), y se leyó la absorbancia del sobrenadante a 525 nm en un espectrofotómetro Shimadzu UV/VIS (Modelo UV-1800). Paralelamente, se realizó una curva de calibración, por duplicado, utilizando concentraciones conocidas de ácido ascórbico. Se partió de una solución stock 4 mM de ácido ascórbico, y se aplicaron diluciones con agua destilada tal que se obtuviesen 400 μL de solución conteniendo 0, 10, 20, 40 y 80 nmoles de ácido ascórbico. A cada solución se le agregaron los mismos reactivos (y en las mismas cantidades) que los mencionados para las muestras. Se incubaron a 37 °C por 1 hora y se midieron las absorbancias a 525 nm. Los valores obtenidos se expresaron en nmoles de ácido ascórbico/ 10^6 células.

Fenoles

La determinación del contenido de compuestos fenólicos se realizó siguiendo el método propuesto por Li et al. (2007). Este método se basa en la reducción de los ácidos fosfomolibdico y fosfotúngstico (reactivo de Folin Ciocalteu) por parte de los fenoles a pH básico, formando un complejo de color azul con un máximo de absorbancia a 765 nm.

Se tomaron alícuotas de 40 mL de cada cultivo y se cosecharon las células centrifugando a 10.000 rpm (15 minutos). A los *pellets* celulares obtenidos se les agregaron 600 μL de buffer fosfato de potasio 0,134 M pH 6,5 conteniendo EDTA 0,1 mM, y se los sonicó aplicando 7 pulsos de 15 segundos a 60 Hz. Se realizó una segunda centrifugación a 11.000 rpm (10 minutos). Se

tomó una alícuota de 200 μ L de cada sobrenadante y se le agregaron 2 mL de Na_2CO_3 7,5 % (p/v) y 2,5 mL de reactivo de Folin Ciocalteu. Se agitó en *vortex*, se incubó a 45 °C durante 15 minutos y se leyó su absorbancia a 765 nm a temperatura ambiente. Paralelamente se realizó una curva de calibración utilizando concentraciones conocidas de ácido gálico. Partiendo de una solución stock de ácido gálico 2,66 mM, se realizaron diluciones con agua destilada tal que se obtuviesen 200 μ L con 0, 10, 20, 40, 80 y 140 nmol de ácido gálico. Se agregaron los mismos reactivos (y en las mismas cantidades) que los mencionados para las muestras. Se agitó en *vortex*, se incubó a 45 °C por 15 min y se midió la absorbancia a 765 nm a temperatura ambiente. El contenido se expresó como nanomoles de equivalentes de ácido gálico/ 10^6 células.

Análisis estadístico

Para el análisis estadístico se utilizó el software *GraphPad Prism* v.6. Los resultados obtenidos, de cada parámetro para cada cepa, se compararon aplicando análisis de la varianza (ANOVA) de un factor, seguido por contrastes “a posteriori” de Dunnet, considerando las diferencias significativas cuando $p < 0,05$. En todos los casos se evaluó previamente el cumplimiento de los supuestos de normalidad y homocedasticidad, considerando las pruebas de Shapiro-Wilks y Levene, utilizando el programa *InfoStat* v. 2014. En los casos necesarios, se transformaron los datos para cumplir con los supuestos de normalidad y homocedasticidad mediante la aplicación de $\ln(x)$, $\log(x)$, \sqrt{x} o $\arcsen(x)$, dependiendo el parámetro analizado.

Resultados

A continuación se presentan los resultados obtenidos de los distintos parámetros analizados en las cepas de *S. acutus* y *R. subcapitata* expuestas a concentraciones crecientes de diclofenac.

Morfología

En la cepa de *S. acutus*, el diclofenac provocó alteraciones en la morfología de las células con respecto de la morfología típica de las células del control (Figura 10a). Los cultivos tratados con diclofenac presentaron ausencia de cenobios y sus células mostraron contracción del cloroplasto, disminución de la coloración (esto último en las células expuestas a la concentración más alta) y ensanchamiento, encontrándose también formas teratológicas (Figura 10b). Las variaciones morfológicas descritas se manifestaron a partir de la concentración de 15 mg diclofenac/L, acentuándose con el aumento de la concentración.

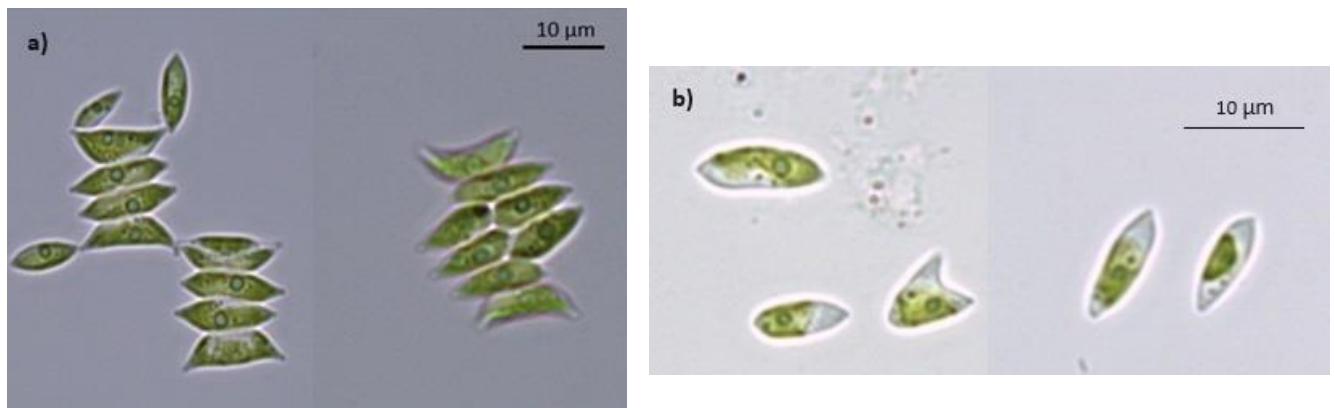


Figura 10. Morfología de las células de *S. acutus* de los cultivos controles y tratados con diclofenac (1000X). a) Células control. b) Células tratadas con 15 a 60 mg diclofenac/L.

En la cepa de *R. subcapitata* la presencia de diclofenac provocó alteraciones en la morfología de las células con respecto de la morfología típica de las células del control (Figura 11a). Los cultivos tratados con diclofenac presentaron células ensanchadas y de mayor tamaño, así como aparición de formas teratológicas (Figura 10b). Las variaciones morfológicas descritas se manifestaron a partir de la concentración de 4 mg diclofenac/L, acentuándose con el aumento de la concentración.

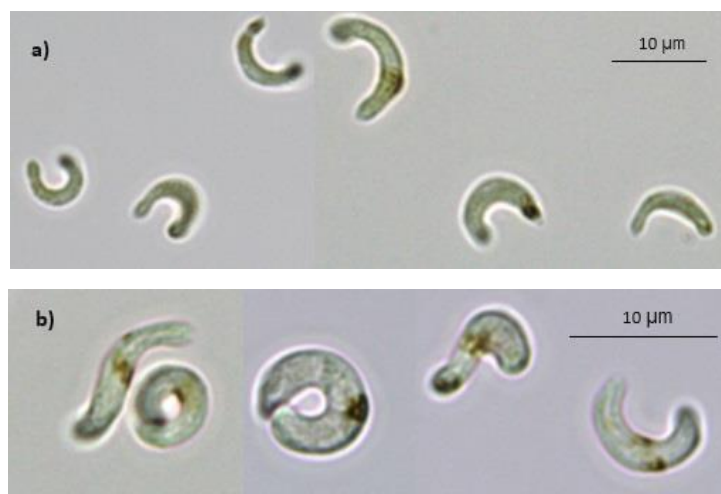


Figura 11. Morfología de las células de *R. subcapitata* de los cultivos controles y tratados con diclofenac (1000X). a) Células control. b) Células tratadas con 4 a 10 mg diclofenac/L.

Crecimiento de los cultivos

La densidad celular de los cultivos de la cepa de *S. acutus* mostró una disminución al aumentar la concentración de diclofenac, la cual resultó estadísticamente significativa con respecto al control en los cultivos expuestos a 60 y 75 mg diclofenac/L (Figura 12a). La CI50 estimada fue de 64,6152 mg diclofenac/L (54,2033 - 85,135 mg diclofenac/L).

La densidad celular de los cultivos de la cepa de *R. subcapitata* mostró una disminución al aumentar la concentración de diclofenac, la cual resultó estadísticamente significativa con respecto al control en los cultivos expuestos a 10 mg diclofenac/L (Figura 12b). La CI50 estimada fue de 7,3434 mg diclofenac/L. Mediante el programa *probit alga* no fue posible calcular los límites inferior y superior de la CI50 para esta cepa.

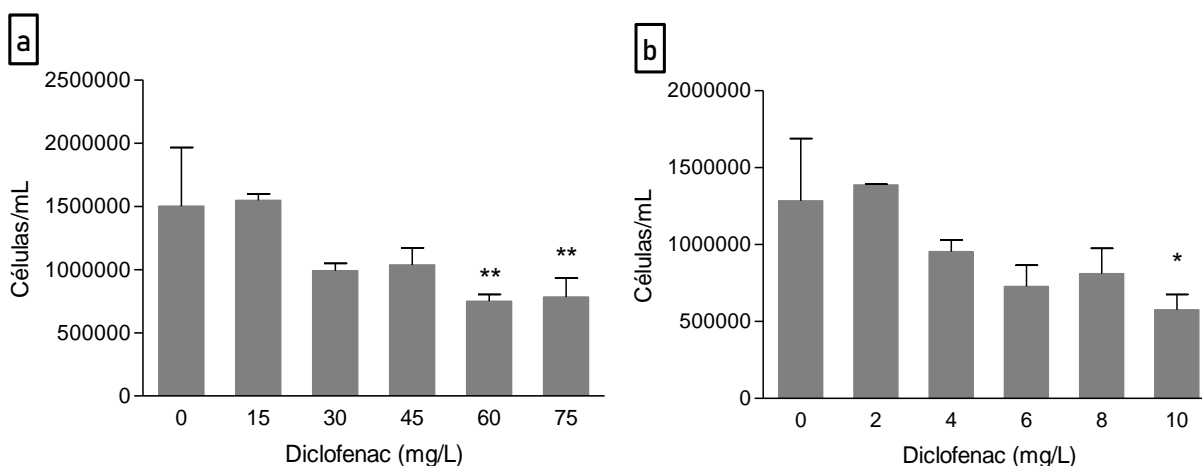


Figura 12. Densidad celular (células/mL) de los cultivos de *S. acutus* (a) y *R. subcapitata* (b) expuestos a

distintas concentraciones de diclofenac. Valores expresados como la media \pm DS. Diferencias significativas con respecto al control: * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, determinadas en base a los datos transformados a $\log(x)$ (*S. acutus*) y los datos sin transformar (*R. subcapitata*).

Biovolumen

Las células de *S. acutus* expuestas a 45, 60 y 75 mg diclofenac/L presentaron un aumento estadísticamente significativo del volumen celular con respecto al control (Figura 13a). Las células de *R. subcapitata* también presentaron un aumento estadísticamente significativo con respecto al control del volumen celular cuando estuvieron expuestas a 6, 8 y 10 mg diclofenac/L (Figura 13b).

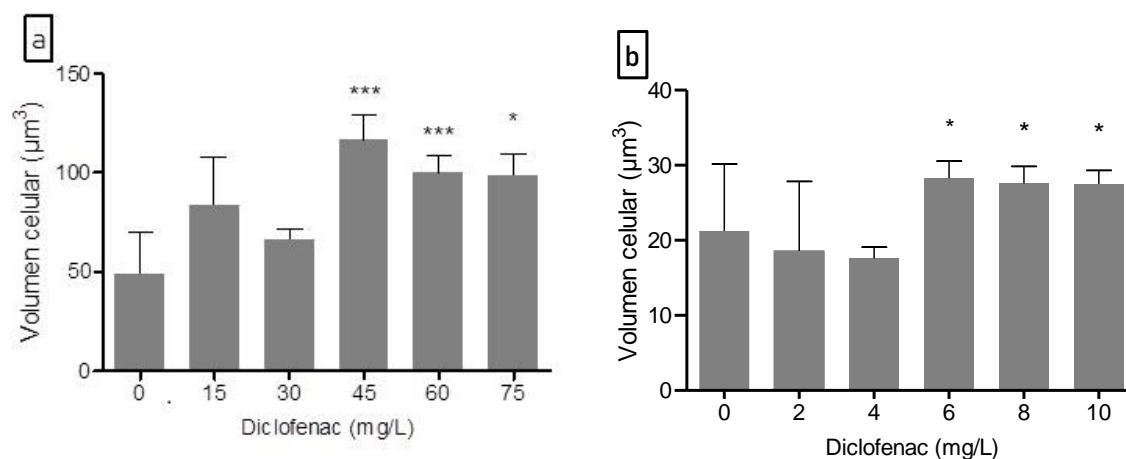


Figura 13. Volumen celular (μm^3) de *S. acutus* (a) y *R. subcapitata* (b) expuestas a distintas concentraciones de diclofenac. Valores expresados como la media \pm DS. Diferencias significativas con respecto al control: * $p < 0.05$, *** $p < 0.001$, determinados en base a los datos transformados a $\log(x)$ para ambas cepas.

Niveles de pigmentos

Para la cepa de *S. acutus* se observó una tendencia al aumento del contenido de clorofila al aumentar la concentración de diclofenac hasta 60 mg diclofenac/L, aunque ese aumento no resultó significativo. Por otro lado, se observó una disminución significativa respecto al control en los cultivos expuestos a 75 mg diclofenac/L. El perfil del contenido de carotenos no mostró un patrón claro, encontrándose únicamente un aumento estadísticamente significativo con respecto al control en las células expuestas a 60 mg diclofenac/L.

Para la cepa de *R. subcapitata* se observó un aumento del contenido de clorofila al aumentar la concentración de diclofenac, el cual resultó estadísticamente significativo respecto al control en las células expuestas a 6 y 10 mg diclofenac/L (Figura 14b). El contenido de carotenos mostró un patrón semejante, presentando un aumento estadísticamente significativo respecto al control en las células expuestas a 10 mg diclofenac/L.

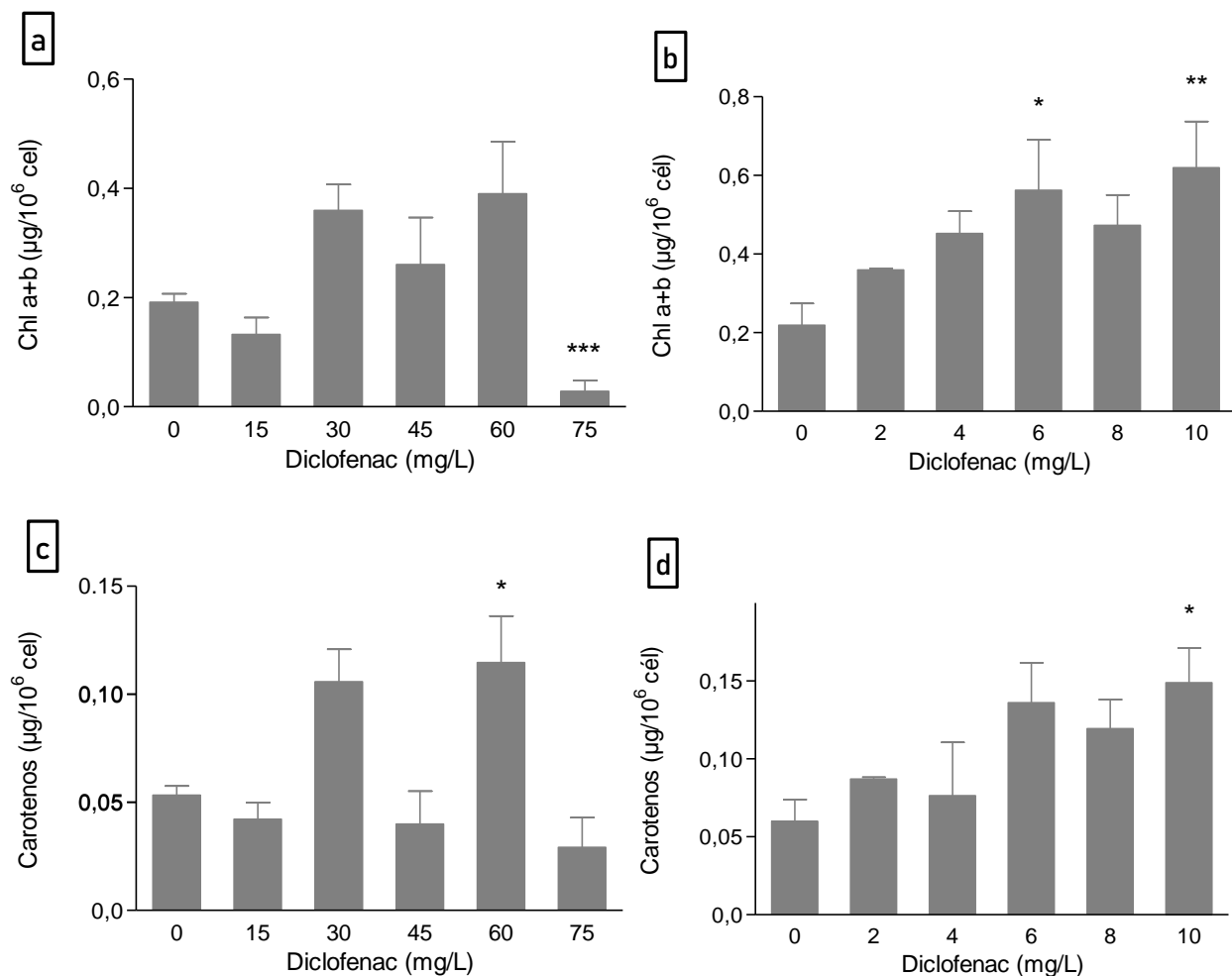


Figura 14. Contenido de pigmentos (µg/10⁶ cél) de las algas expuestas a distintas concentraciones de diclofenac. a) Clorofila a+b de *S. acutus*. b) Clorofila a+b de *R. subcapitata*. c) Carotenos de *S. acutus*. d) Carotenos de *R. subcapitata*. Valores expresados como la media ± DS. Diferencias significativas con respecto al control *p<0.05; **p<0.01; ***p<0.001, determinadas en base a los datos transformados a $\ln(x)$ para ambas cepas.

Parámetros de estrés oxidativo

Niveles de peroxidación lipídica

Los resultados de la evaluación de los niveles de peroxidación lipídica en la cepa de *S. acutus* mostraron un patrón de aumento del contenido de sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico

(TBARS) conforme aumenta la concentración del diclofenac. Ese aumento resultó ser estadísticamente significativo con respecto al control cuando las células estuvieron expuestas a 30, 45 y 60 mg diclofenac/L (Figura 15a).

Para la cepa de *R. subcapitata* no se detectaron diferencias significativas respecto al control; sin embargo, se observó una tendencia al aumento en el contenido de TBARS conforme aumentan los niveles del antiinflamatorio (Figura 15b).

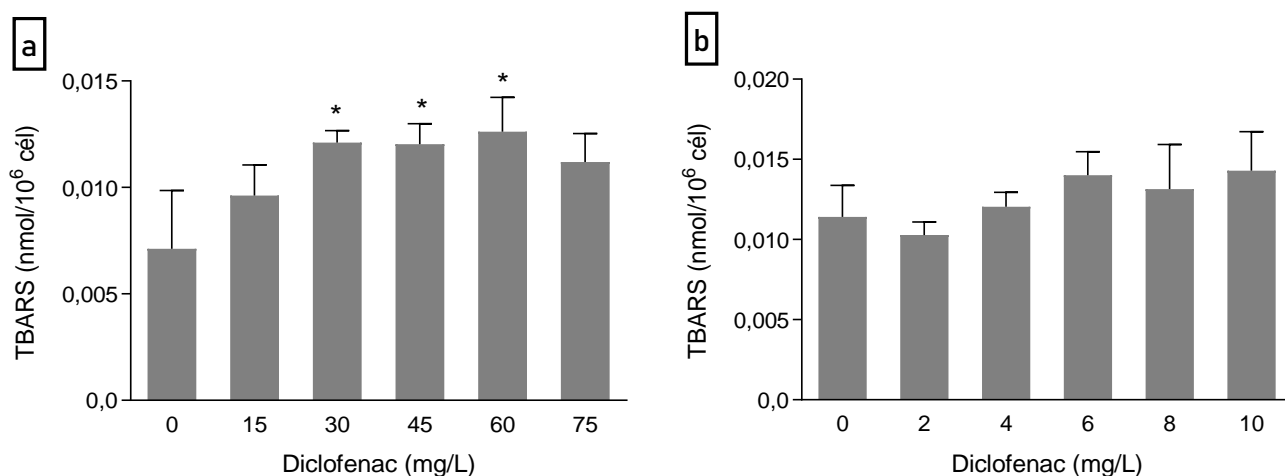


Figura 15. Niveles de TBARS (nmol/10⁶ cél) de *S. acutus* (a) y *R. subcapitata* (b) expuestas a distintas concentraciones de diclofenac. Valores expresados como la media \pm DS. Diferencias significativas respecto al control: * $p < 0.05$, determinadas en base a los datos sin transformar para ambas cepas.

Niveles de ácido ascórbico

Los resultados de la evaluación de los niveles de ácido ascórbico en la cepa de *S. acutus* mostraron un patrón de aumento conforme aumentan los niveles del antiinflamatorio, presentando un nivel basal (control) de $1,6 \pm 0,4$ nmol/10⁶ cél. El aumento en los niveles de ácido ascórbico con respecto al control resultó estadísticamente significativo en las células expuestas a 60 y 75 mg diclofenac/L (Figura 16a).

Para la cepa de *R. subcapitata* puede observarse un patrón de aumento en el contenido de ácido ascórbico conforme aumentan los niveles del antiinflamatorio, con un nivel basal (control) de $0,0084 \pm 0,003$ nmol/10⁶ cél (190 veces menor al de *S. acutus*). El aumento en el contenido de ácido ascórbico con respecto al control resultó estadísticamente significativo en las células expuestas a 10 mg diclofenac/L (Figura 16b).

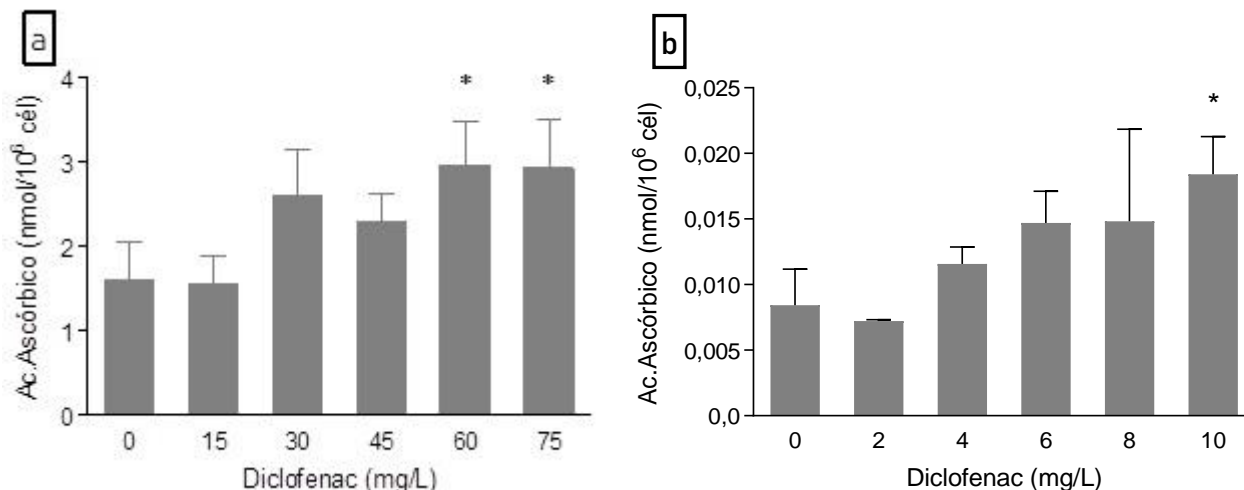


Figura 16. Niveles de ácido ascórbico (nmol/10⁶ cél) de *S. acutus* (a) y *R. subcapitata* (b) expuestas a distintas concentraciones de diclofenac. Valores expresados como la media \pm DS. Diferencias significativas respecto al control: * $p < 0.05$, determinadas en base a los datos sin transformar (*S. acutus*) y los datos transformados a $\ln(x)$ (*R. subcapitata*).

Niveles de fenoles

Los resultados de la evaluación de los niveles de fenoles en la cepa de *S. acutus* mostraron un patrón de aumento conforme aumentan los niveles del antiinflamatorio con un valor máximo de $1,11 \pm 0,35$ nmol/10⁶ cél. El aumento en los niveles de fenoles fue estadísticamente significativo con respecto al control en las células expuestas a 45, 60 y 75 mg diclofenac/L (Figura 17a). Para la cepa de *R. subcapitata* también se observó un patrón de aumento en el contenido de compuestos fenólicos conforme aumentan los niveles del antiinflamatorio, con un valor máximo de $0,71 \pm 0,14$ nmol/10⁶ cél. El aumento en los niveles de fenoles con respecto al control fue estadísticamente significativo en las células expuestas a 10 mg diclofenac/L (Figura 17b).

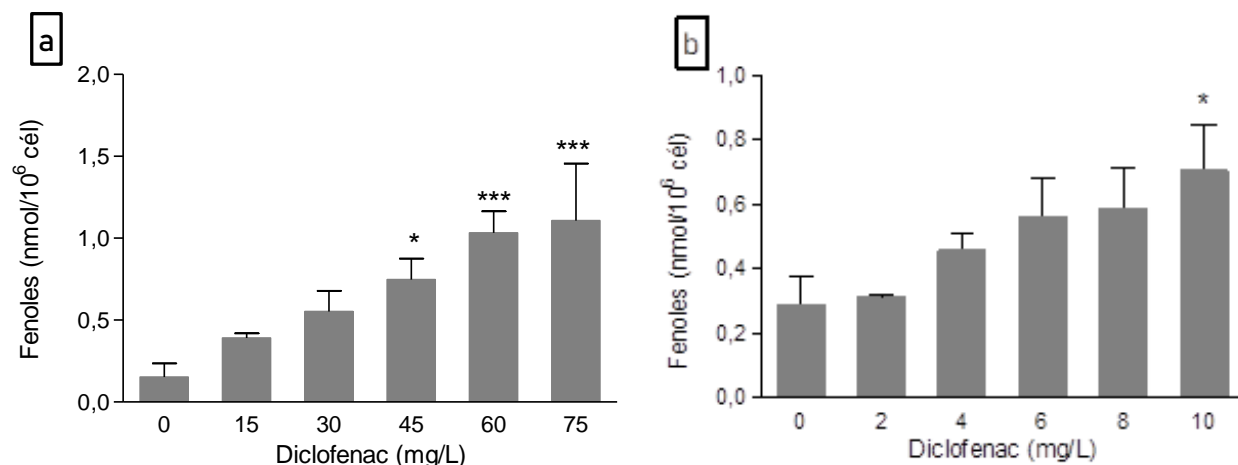


Figura 17. Contenido de fenoles (nmol/10⁶ cél) de *S. acutus* (a) y *R. subcapitata* (b) expuestas a distintas concentraciones de diclofenac. Valores expresados como la media \pm DS. Diferencias significativas respecto al control: * $p < 0.05$, *** $p < 0.001$, determinados en base a los datos sin transformar para ambas cepas.

Discusión

El diclofenac es uno de los antiinflamatorios no esteroideos de mayor uso a nivel medicinal y veterinario en el mundo (Santos et al., 2010). Debido a su uso masivo y a su resistencia al tratamiento en las plantas depuradoras de aguas residuales, este fármaco es usualmente encontrado en los ambientes acuáticos. Las cuencas hídricas propias de áreas densamente pobladas están expuestas al ingreso de este fármaco junto con un gran número de otros de los compuestos denominados contaminantes de preocupación emergente (CPE). Debido a esto, los organismos de los ecosistemas acuáticos pueden verse afectados, incluyendo los que forman parte de comunidades clave, como las microalgas fitoplanctónicas (Gil Arroyo, 2015, Linson Lonappan et al., 2016).

La realización de bioensayos algales de laboratorio permite obtener datos útiles para evaluar la sensibilidad de distintas especies y entender los mecanismos de toxicidad de distintos contaminantes ambientales, así como obtener información valiosa para las evaluaciones ecotoxicológicas (Hoffman et al., 2003, Stevenson y Smol, 2003). Las microalgas verdes planctónicas, tales como diferentes especies del género *Scenedesmus*, son organismos útiles en estudios ecotoxicológicos debido a su amplia distribución a nivel mundial en distintos hábitats acuáticos y a su capacidad de rápida respuesta a los cambios en los ecosistemas (Fodorpatiki et al., 2009). El diclofenac es uno de los analgésicos detectado en aguas residuales de nuestro

país (Elorriaga et al., 2013a). Teniendo en cuenta la cantidad de efluentes cloacales urbanos (domiciliarios, industriales, hospitalarios) que ingresan al Río Matanza-Riachuelo, es probable que el diclofenac se encuentre impactando sobre la biota de este sistema acuático, y en este sentido las cepas de microalgas autóctonas podrían estar adaptadas a la contaminación reinante. Considerando que diferentes especies de microalgas pueden presentar distinta sensibilidad frente a determinados contaminantes, resulta importante realizar evaluaciones ecotoxicológicas sobre cepas autóctonas que se encuentren adaptadas a las condiciones de las cuencas hídricas de nuestra región y reflejen el impacto que sufren por parte de los diversos xenobióticos allí presentes.

En la presente tesis se evaluó la toxicidad del diclofenac sobre una cepa autóctona de *Scenedesmus acutus* (Chlorophyta) aislada de Río Matanza-Riachuelo, en comparación con la cepa estándar de colección internacional de *Raphidocelis subcapitata* (Chlorophyta), catalogada como organismo “test” en normas internacionales de calidad de aguas. Para ello se evaluaron, en ambas cepas, distintos parámetros que pueden reflejar el potencial efecto tóxico de dicho fármaco.

Los resultados obtenidos al estudiar el crecimiento de los cultivos mostraron que el diclofenac tiene efectos tóxicos, provocando la inhibición del crecimiento de ambas cepas conforme aumenta su concentración (Figura 12). La estimación de la CI50 del diclofenac para las dos cepas muestra que para *S. acutus* la CI50 (64,62 mg diclofenac/L (54,2033 - 85,135 mg diclofenac/L)) es alrededor de 9 veces mayor a la CI50 obtenida para *R. subcapitata* (7,34 mg diclofenac/L). Estos resultados muestran la diferente sensibilidad que presentan las cepas estudiadas. Teniendo en cuenta la directiva técnica de la Comisión de la Comunidad Europea sobre la evaluación de riesgo de nuevas sustancias presentes en el ambiente y su peligrosidad para el ambiente acuático (“Directiva 67/548/EEC”), y considerando el valor de CI50 obtenido para la cepa de *S. acutus* (64,62 mg diclofenac/L) la sustancia sería catalogada como dañina para la biota acuática (CI50 en algas entre 10 y 100 mg/L, Carlsson et al., 2006), mientras que si se toma en cuenta la CI50 obtenida para *R. subcapitata* (7,34 mg diclofenac/L) la sustancia sería catalogada como tóxica para la biota acuática (CI50 en algas entre 1 y 10 mg/L, Carlsson et al., 2006). Esto muestra la necesidad de que los análisis ecotoxicológicos tomen en cuenta una diversidad de especies, incluyendo especies con menor y mayor sensibilidad, de manera de seleccionar la especie más sensible (tal como recomienda la Directiva).

Las CI50 obtenidas en esta tesis también muestran que la cepa de *S. acutus* es más tolerante al diclofenac que la cepa de *R. subcapitata*. Y, en relación con esto, trabajos previos demostraron que la cepa BAFC CA 13 de *S. acutus* utilizada en esta tesis es más tolerante que otras cepas

de microalgas verdes frente al diclofenac (Takara, 2022) y frente a ciertos contaminantes como el herbicida Glifosato (Pérez, 2017). Se ha postulado que la diferencia en la sensibilidad de las distintas especies/cepas de microalgas puede deberse a características morfológicas y estructurales como el tamaño, el volumen celular, la presencia o ausencia de pared celular y su composición química, así como a mecanismos fisiológicos de detoxificación, de respuesta al estrés o de absorción de los tóxicos (Levy et al., 2007, Sabatini et al., 2009, Schiariti et al., 2004; Tang et al., 1998). Las especies de *Scenedesmus* se caracterizan por una pared celular altamente resistente compuesta por el polímero hidrofóbico “algaenano” (Schiariti et al., 2004, Soeder y Hegewald, 1988), lo cual podría conferirle cierta resistencia al ingreso de los contaminantes. Adicionalmente, algunos autores postulan que las especies de menor tamaño y volumen son más sensibles a los tóxicos, debido a la mayor relación superficie volumen de sus células (Levy et al., 2007, Quigg et al., 2006, Vendrell et al., 2009). Tanto las descripciones originales como los resultados de esta tesis muestran que *R. subcapitata* posee menor tamaño y volumen que *S. acutus* ($21,25 \pm 8,91 \text{ mm}^3$ vs. $48,85 \pm 20,91 \text{ mm}^3$), lo cual podría explicar, en parte, su mayor sensibilidad. Además, debe destacarse que la cepa de *S. acutus* fue aislada del río Matanza-Riachuelo, el cual es un sistema acuático que recibe el ingreso de una gran cantidad de contaminantes, incluyendo CPE entre los que muy probablemente se encuentre el diclofenac. Distintos autores han planteado que los organismos que se desarrollan en ambientes altamente contaminados podrían presentar cierto grado de adaptación y tolerancia (Rai et al., 1996). Este podría ser el caso de la cepa BAFC CA 13 de *S. acutus*, que podría estar adaptada a la presencia de fármacos y otros CPE, lo cual se reflejaría en una mayor tolerancia a este fármaco en comparación con la cepa de *R. subcapitata*. La CI50 del diclofenac para las dos cepas estudiadas muestra que estas microalgas toleran concentraciones muy superiores a las informadas hasta el momento en cuerpos de agua de Argentina ($0,145 - 1,2 \text{ } \mu\text{g/L}$, Elorriaga et al., 2013 a y b, Valdés et al., 2014) y del mundo ($0,011 - 759,06 \text{ } \mu\text{g/L}$) (Ferreira do Nascimento et al., 2023, Ginebreda et al., 2010, Sathishkumar et al., 2020). De todas formas, la toxicidad evidenciada pone de manifiesto el riesgo al que están expuestos los ecosistemas acuáticos, por ejemplo, en momentos de descargas de efluentes conteniendo una alta concentración del fármaco.

Si bien no existe mucha información sobre los efectos del diclofenac en algas verdes, al considerar los datos bibliográficos se observa que, para las cepas estudiadas por distintos autores, los valores de CI50 muestran mucha variación (Tabla 3).

Tabla 3. Valores bibliográficos de CI50 del diclofenac para distintas especies de microalgas.

<i>Scenedesmus acutus</i>	85,81 mg/L (72 h)	Takara (2022)
<i>Scenedesmus acutus</i>	64,4 mg/L (96 h)	Esta Tesis
<i>Scenedesmus vacuolatus</i>	48,1 mg/L (24 h)	Schulze et al. (2010)
<i>Desmodesmus subspicatus</i>	72 mg/L (24 h)	Cleuvers (2004)
<i>Desmodesmus subspicatus</i>	60,44 mg/L (72 h)	Doležalová Weissmannová et al. (2018)
<i>Raphidocelis subcapitata</i>	8,03 mg/L (72 h)	Takara (2022)
<i>Raphidocelis subcapitata</i>	7,34 mg/L (96h)	Esta Tesis
<i>Raphidocelis subcapitata</i>	0,03 mg/L (96 h)	Russo et al. (2023)
<i>Dunaliella tertiolecta</i>	0,185 mg/L (96 h)	De Lorenzo y Fleming (2008)
<i>Chlamydomonas reinhardtii</i>	135 mg/L (24 h)	Majewska et al. (2018)

Distintas variables experimentales (como el número inicial de células, la composición del medio de cultivo, el volumen de ensayo, la intensidad lumínica, la temperatura, el tiempo de exposición) y principalmente la especie/cepa particular de microalga, pueden afectar los resultados del bioensayo de toxicidad y así el rango de CI50 estimada (Franklin et al., 2002, Stratton y Gil, 1990). Las diferencias en los valores de CI50 del diclofenac obtenidas para las distintas especies de microalgas (Tabla 3) puede deberse tanto a la sensibilidad diferencial que presentan las distintas especies al fármaco, como a la variación en las diversas variables experimentales empleadas en cada caso de estudio. Centrándonos en la comparación de las CI50 obtenidas para las cepas específicamente utilizadas en esta tesis, se observa que la CI50 obtenida para la cepa de *S. acutus* en esta tesis difiere de la obtenida por Takara (2022) (Tabla 3). Se ha demostrado que el volumen de ensayo y el tamaño del inóculo (densidad celular inicial del ensayo) inciden sobre los resultados de toxicidad estableciéndose que, para una misma microalga y un mismo tóxico, la disminución del volumen genera un aumento en la CI50 del contaminante, al igual que lo hace un aumento del tamaño del inóculo (Franklin et al., 2022, Stratton y Gil, 1990). Por lo que la diferencia entre los valores de CI50 del diclofenac para la cepa BAFC CA 13 de *S. acutus*, podría deberse a las condiciones experimentales aplicadas por Takara (2022): menor volumen de ensayo (20 mL) y mayor tamaño de inóculo (100.000 células/mL). En cuanto a la cepa de *R. subcapitata* se observa que la CI50 obtenida en esta tesis es similar a la obtenida por Takara (2022) pero es muy superior a la obtenida por Russo et al. (2023). Esto último se relacionaría con las condiciones experimentales del bioensayo, ya que dichos autores llevaron

adelante sus bioensayos con un inóculo inicial 1 orden de magnitud menor al utilizado en esta tesis.

El efecto tóxico del diclofenac también se evidenció en las alteraciones provocadas en la morfología celular de ambas cepas. En la cepa de *S. acutus* las alteraciones morfológicas se visualizaron a partir de la concentración de 15 mg diclofenac/L, mientras que el análisis del crecimiento de los cultivos mostró una inhibición estadísticamente significativa a partir de la concentración de 60 mg diclofenac/L. Algo similar ocurre para la cepa de *R. subcapitata*, donde las alteraciones morfológicas se observaron a partir de los 4 mg diclofenac/L y la inhibición estadísticamente significativa del crecimiento se observó a partir de los 10 mg diclofenac/L. Por lo tanto, el análisis de la variación morfológica de las células nos permitió detectar efectos tóxicos producidos por el fármaco a concentraciones más bajas, ya que se pudieron observar efectos concretos sobre la morfología incluso a concentraciones de diclofenac que no provocaron diferencias estadísticamente significativas del crecimiento de los cultivos con respecto al control.

Los resultados de la evaluación del volumen celular mostraron que el tratamiento con diclofenac indujo un aumento del biovolumen en ambas cepas, presentando diferencias estadísticamente significativas respecto al control a partir del cultivo tratado con 45 mg diclofenac/L para *S. acutus*, y con 6 mg diclofenac/L para *R. subcapitata*. Distintos autores informaron este mismo efecto en *R. subcapitata* expuesta a metales pesados (Franklin et al., 2002, Machado y Soares, 2014, Yamagishi et al., 2017) y en otras microalgas verdes (*Chlorella kessleri*, *Scenedesmus vacuolatus*) expuestas a otro tipo de contaminantes como los herbicidas glifosato e imazetapir (Fassiano et al., 2022, Iummato et al., 2019, Romero et al., 2011). Además, Harshkova et al. (2021) y Majewska et al. (2018) mostraron que el diclofenac provocaba un aumento del volumen celular en la microalga verde *Chlamydomonas reinhardtii*. El aumento del biovolumen y los cambios morfológicos observados en *S. acutus* y *R. subcapitata* podrían estar relacionados con alteraciones a nivel fisiológico (como las relacionadas a daño oxidativo que discutiremos más adelante), así como con posibles alteraciones del ciclo celular, como ha sido informado para *C. reinhardtii* por Harshkova et al. (2021).

La alteración en el contenido de pigmentos es otro parámetro de gran utilidad para la determinación de los efectos tóxicos sobre organismos autótrofos, ya que estos son fundamentales para el buen funcionamiento del aparato fotosintético. En líneas generales, la presencia de ciertos xenobióticos, incluido el diclofenac, generan la disminución del contenido de pigmentos en cepas de microalgas verdes (Harshkova et al. 2021, Majewska et al. 2018). Sin embargo, los resultados de esta tesis mostraron que el diclofenac provocó un aumento del contenido de Chl *a+b* en las células de *R. subcapitata*, que resultó significativo para las

concentraciones más altas. Se ha informado que algunos xenobióticos pueden inducir el aumento del contenido de clorofila en ciertas microalgas, respuesta conocida como “efecto *greening*” que actuaría posiblemente como un mecanismo homeostático para compensar la inhibición de la fotosíntesis por efectos adversos en el sistema tilacoidal del Fotosistema II (Carusso, 2017, Fassiano, 2016, Tlili et al., 2011). En la cepa de *S. acutus*, en cambio, se observó una tendencia al aumento del contenido de clorofila *a+b* (aunque no significativa, probablemente debido a la alta variabilidad de los resultados) hasta los 60 mg diclofenac/L y una disminución significativa en la concentración más alta (75 mg diclofenac/L). Aunque el perfil observado en las menores concentraciones de exposición a diclofenac podría indicar un posible caso de “efecto *greening*”, 75 mg diclofenac/L parecen haber sido suficientes para provocar un daño a pigmentos, como lo indica la fuerte disminución (90% menor respecto del valor control) del contenido de chl *a+b* en las células expuestas a dicha concentración. En concordancia con esto, un estudio realizado en *R. subcapitata* mostró un perfil similar cuando los cultivos fueron tratados con el antibiótico eritromicina, con un aumento del contenido de Chl *a* al aumentar la concentración del fármaco y un fuerte descenso al ser tratado con la concentración más alta (Machado y Soares, 2019).

Como se mencionó en la Introducción, se ha demostrado que los contaminantes pueden provocar una situación de estrés oxidativo en las células, por inducir la generación de ERO (Stohs y Bagchi, 1995, Valavanidis et al., 2006) que producen daño oxidativo a macromoléculas (proteínas, lípidos, ADN, etc.) y desencadenan respuestas antioxidantes (Agrawal y Sharma, 2010, Romero et al., 2011). Distintos parámetros de estrés oxidativo, como el aumento en el contenido de EROS, el daño a lípidos, proteínas o ADN y la alteración del sistema antioxidante celular, pueden utilizarse como biomarcadores de exposición o efecto de distintos contaminantes (Torres et al., 2008, Valavanidis et al., 2006). En esta tesis, el aumento de la concentración de diclofenac provocó alteraciones en los biomarcadores de estrés oxidativo que fueron analizados, observándose un aumento del daño a lípidos y de las defensas antioxidantes en las dos cepas. Dado que no se pudieron medir niveles de ERO no puede asegurarse que las células se encuentren en una situación de estrés oxidativo. Sin embargo, se observó daño oxidativo a lípidos e inducción de las respuestas antioxidantes.

La inducción del sistema antioxidante puede considerarse como una respuesta para adaptarse a la situación de estrés, y una disminución de la respuesta antioxidante puede llevar a un estado vulnerable a las células, con consecuentes efectos a nivel poblacional. Los niveles de respuesta antioxidante pueden variar significativamente entre distintas especies de microalgas (Lei et al., 2006). Esas diferencias pueden estar relacionadas con la sensibilidad de las especies a distintos contaminantes y por ello en esta tesis se compararon parámetros de estrés oxidativo

en *S. acutus* (cepa que resultó ser más tolerante) y la cepa estándar internacional de *R. subcapitata* (cepa que resultó más sensible en nuestro estudio y se considera muy sensible a los contaminantes en general). Nuestros resultados mostraron una inducción de las defensas antioxidantes analizadas (ácido ascórbico, fenoles y carotenos), con diferencias entre las dos cepas en la respuesta de esas defensas.

Los carotenos presentan propiedades antioxidantes e intervienen en el sistema de defensa, principalmente captando electrones de la clorofila triplete y neutralizando ERO en los fotosistemas (Salguero et al., 2003). Por lo tanto, un aumento en el contenido de carotenos estaría marcando una respuesta frente al aumento de ERO inducido por un contaminante. Los resultados de esta tesis mostraron un aumento estadísticamente significativo, con respecto al control, del contenido de carotenos en las células de *S. acutus* tratadas con 60 mg diclofenac/L y en las células de *R. subcapitata* tratadas con 10 mg diclofenac/L. Aunque no se pudieron medir niveles de ERO, el aumento en el contenido de carotenos observado para ambas cepas podría estar mostrando su participación en la respuesta antioxidante frente al estrés inducido por el diclofenac. Los carotenos son compuestos antioxidantes liposolubles que intervienen en entornos relacionados a membranas (Di Mascio et al., 1991). Pero también existen compuestos antioxidantes hidrosolubles que tienen un rol muy importante en la respuesta al estrés, como son el ácido ascórbico y los compuestos fenólicos. Para la cepa de *S. acutus*, los resultados obtenidos mostraron un aumento estadísticamente significativo, con respecto al control, del contenido de ácido ascórbico en las células expuestas a 60 y 75 mg diclofenac/L y del contenido de fenoles en las células expuestas a 45, 60 y 75 mg diclofenac/L. Para la cepa de *R. subcapitata* los resultados mostraron una tendencia al aumento del contenido celular de ambos antioxidantes (ácido ascórbico y fenoles), que resultó ser estadísticamente significativo, con respecto al control, en las células expuestas a la concentración más alta de diclofenac (10 mg diclofenac/L). Aunque sería necesario complementar con la medición de niveles de ERO, el aumento del contenido de estos dos antioxidantes no enzimáticos indicaría su participación en el mecanismo de respuesta celular al posible estrés inducido por el diclofenac.

Como se mencionó anteriormente, los niveles de respuesta antioxidante pueden variar entre distintas especies de microalgas y ello puede relacionarse con la sensibilidad de las especies a los tóxicos. En este sentido, el máximo nivel alcanzado de compuestos fenólicos en la cepa de *S. acutus* ($1,1 \pm 0,35$ nmol/ 10^6 cél) fue 1,5 veces mayor que el máximo nivel alcanzado en *R. subcapitata* ($0,71 \pm 0,14$ nmol/ 10^6 cél). Y, particularmente, merece destacarse que el nivel basal (control) de ácido ascórbico en la cepa de *S. acutus* ($1,6 \pm 0,4$ nmol/ 10^6 cél) fue 190 veces mayor al nivel basal de la cepa de *R. subcapitata* ($0,0084 \pm 0,003$ nmol/ 10^6 cél), y el máximo nivel

alcanzado de este antioxidante fue 161 veces mayor en *S. acutus* ($2,9 \pm 0,6$ nmol/ 10^6 cél) que en *R. subcapitata* ($0,018 \pm 0,003$ nmol/ 10^6 cél). El ácido ascórbico actúa como el principal antioxidante en los organismos fotosintéticos (luego de, o en conjunto con el GSH), dado que puede participar directamente neutralizando ERO y previniendo así el daño oxidativo. A su vez interviene como co-sustrato de antioxidantes enzimáticos como la ascorbato aeroxidasa (Asada, 1992). Un nivel basal alto de ácido ascórbico le podría estar otorgando a la cepa de *S. acutus* una mayor capacidad de respuesta al aumento de ERO generadas por el diclofenac, confiriéndole así una mayor tolerancia al estrés inducido por el fármaco. Estos resultados podrían explicar, en parte, la mayor tolerancia de la cepa de *S. acutus* con respecto a la cepa de *R. subcapitata*. Sin embargo, para apoyar esto deberían realizarse futuros ensayos donde se consideren, para ambas cepas, rangos de concentración similares y/o un mayor número de concentraciones en común, a fin de evaluar la variación en los niveles de antioxidantes frente al mismo tipo de exposición.

Otro parámetro biomarcador de estrés oxidativo es el nivel de peroxidación lipídica, indicado por la producción de sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico (TBARS). Los resultados mostraron, para la cepa de *S. acutus*, un aumento estadísticamente significativo con respecto al control, del daño oxidativo a lípidos (TBARS) a partir de 30 mg diclofenac/L. A pesar de que para esta cepa se observaron niveles basales altos de ácido ascórbico y un aumento significativo de este antioxidante y del contenido de fenoles, la acción de estos antioxidantes pareciera no haber sido suficiente para neutralizar el daño a lípidos a altas concentraciones del fármaco. El aumento de daño oxidativo a lípidos podría explicar la decoloración celular observada al microscopio óptico en las células expuestas a la mayor concentración de diclofenac, ya que las membranas tilacoidales son muy susceptibles al ataque por ERO y a sufrir peroxidación lipídica (De María et al., 2005). Además, el aumento de peroxidación lipídica puede provocar un aumento de fluidez de membranas, lo cual podría relacionarse con el aumento detectado en el volumen celular (Iummato et al., 2019). Para la cepa de *R. subcapitata*, si bien parece haber una tendencia al aumento en las concentraciones más altas de diclofenac, no se detectaron diferencias significativas respecto al control en los valores de TBARS. Es probable que, en esta cepa, el aumento de los niveles de ácido ascórbico y fenoles a partir de su nivel basal esté amortiguando el daño a lípidos. A pesar de que para esta cepa se detectaron niveles basales bajos de ácido ascórbico, y se detectaron valores de ácido ascórbico y fenoles significativamente mayores al control únicamente para las células tratadas con la mayor concentración de diclofenac, no debe descartarse el hecho de que hay una batería de antioxidantes (enzimáticos y no enzimáticos) que no han sido medidos en esta tesis y que podrían estar evitando el daño a lípidos.

De acuerdo con la revisión bibliográfica realizada podemos decir que, salvo por el trabajo de Majewska et al. (2018), no existen trabajos donde se evalúe estrés oxidativo en microalgas expuestas a diclofenac. Los autores mencionados propusieron que el diclofenac induciría estrés oxidativo en *Chlamydomonas reinhardtii*, ya que observaron un aumento de los niveles de ERO y de la actividad de la enzima antioxidante catalasa. El aumento de daño a lípidos junto con el aumento de los compuestos antioxidantes (carotenos, ácido ascórbico y fenoles) observados en esta tesis, podrían ser indicios de la posible participación del estrés oxidativo en los efectos tóxicos del diclofenac hacia las dos cepas estudiadas. Sin embargo, para corroborar esto será necesario realizar futuros estudios evaluando los niveles de ERO.

Las diversas especies/cepas de microalgas de cuerpos de agua receptores de mezclas complejas de contaminantes que incluyan fármacos pueden ser afectadas de manera diferencial. Esto puede derivar en una dominancia de especies tolerantes y una desaparición de especies sensibles, conduciendo a un desequilibrio en el ecosistema. La evaluación de la sensibilidad/tolerancia de especies de esos cuerpos de agua puede aportar información relevante para el entendimiento del impacto de los fármacos en el ambiente acuático. En base a los resultados de CI50 obtenidos en esta tesis podría considerarse que, frente a una situación de contaminación con diclofenac en un sistema acuático, con concentraciones similares a las empleadas en estos ensayos, *S. acutus* podría desplazar a *R. subcapitata*. Además, teniendo en cuenta los efectos observados para los diversos parámetros analizados a concentraciones menores a las de las CI50 de ambas cepas (variación morfológica, variación del biovolumen, niveles de antioxidantes, de peroxidación lipídica), frente a un escenario de contaminación con diclofenac, ambas cepas podrían sufrir efectos morfológicos, fisiológicos y bioquímicos, incluso a concentraciones que no impliquen un desplazamiento de una cepa sobre la otra. Esto resalta la importancia de realizar bioensayos que consideren el análisis de distintos parámetros, que permitan tener una visión más amplia acerca de los efectos que puedan sufrir las cepas estudiadas, y que abarquen el análisis de los posibles efectos subletales, sin dejar de considerar la respuesta en el crecimiento de los cultivos.

De todos modos, hay que destacar el hecho de que los resultados obtenidos a partir de bioensayos llevados a cabo en el laboratorio son una aproximación a los efectos producidos por el fármaco en el ambiente. Teniendo en cuenta el contexto ecológico/ambiental, las diversas variables que interactúan en los ambientes acuáticos (temperatura, material en suspensión, mezcla de compuestos, relaciones bióticas y abióticas, etc.) determinarían que los efectos *in situ* puedan diferir de los observados en el laboratorio. Además, dado que la comunidad fitoplanctónica forma parte de la base de las cadenas tróficas acuáticas (junto con el loop

microbiano), los posibles efectos tóxicos ejercidos por los contaminantes en los niveles tróficos basales (tales como variación en la riqueza y abundancia de las distintas especies, además del potencial efecto de bioacumulación de sustancias tóxicas) podrían afectar a los niveles superiores, alterando el equilibrio del ecosistema (Fassiano et al., 2013, Hoffman et al., 2003). Por lo tanto, resulta importante realizar estudios ecotoxicológicos que consideren a organismos representantes de distintos niveles tróficos, para así obtener información más detallada sobre los efectos de los CPE sobre los ecosistemas acuáticos; y más específicamente resulta de gran importancia realizar estudios sobre organismos propios de los sistemas acuáticos de Argentina, a fin de conocer los efectos sobre la biota nativa. Este trabajo de tesis constituye un aporte en ese sentido, aportando información ecotoxicológica con una cepa autóctona de microalga. Debemos aclarar, también, que se trata de un estudio preliminar que nos permite establecer la necesidad de repetir ensayos agregando un mayor número de marcadores, y un mayor número de concentraciones considerando valores en común entre los rangos de concentración de exposición de ambas cepas de microalgas. Si bien se trata de un estudio con un enfoque “multiparámetro”, que involucra el análisis de marcadores morfológicos, fisiológicos y bioquímicos, el agregado de nuevos marcadores relacionados a estrés oxidativo podría permitir tener un mejor panorama del efecto del diclofenac y del tipo de respuesta de las dos cepas. Por otra parte, la detección de una alta tolerancia al diclofenac para la cepa de *S. acutus* del río Matanza-Riachuelo, podría abrir la perspectiva para futuros trabajos de biorremediación. Sobre la base de la capacidad que presentan algunas microalgas para acumular y/o degradar contaminantes, incluyendo el diclofenac (Escapa Santos, 2017, Ferrera-Cerrato et al., 2006, Sánchez Sandoval, 2021, Trentini et al., 2017) resultaría interesante la realización de futuros estudios para evaluar la capacidad de esta cepa para acumular, transformar y/o degradar dicho fármaco, y así considerar su aplicación en tratamientos de biorremediación de efluentes contaminados que contengan diclofenac.

Conclusiones

A partir del análisis de los resultados obtenidos, y considerando las hipótesis planteadas, puede concluirse que:

- El diclofenac tiene efectos tóxicos sobre la cepa autóctona de *S. acutus* y la cepa no autóctona de *R. subcapitata*, afectando el metabolismo de ambas cepas.
- Las dos cepas de microalgas presentan diferente susceptibilidad al diclofenac, siendo la cepa de *S. acutus* la más tolerante y la cepa de *R. subcapitata* la más sensible.
- El diclofenac induce una respuesta antioxidante en ambas cepas, evidenciada por el aumento de las defensas antioxidantes no enzimáticas ácido ascórbico, fenoles y carotenos
- El aumento de defensas antioxidantes inducido por diclofenac por *S. acutus*, no habría sido suficiente para contrarrestar el daño oxidativo a lípidos. La toxicidad del diclofenac, en *S. acutus*, involucra la generación de daño oxidativo a lípidos.

Referencias Bibliográficas

- ACUMAR (2024). Características de la Cuenca Matanza Riachuelo. Autoridad de Cuenca Matanza Riachuelo. <https://www.acumar.gob.ar/caracteristicas-cuenca-matanza-riachuelo/> (último acceso: Febrero 2024).
- Agrawal, A. N. J. U., Sharma, B. (2010). Pesticides induced oxidative stress in mammalian systems. *Int. J. Biol. Med. Res.* 1(3): 90-104.
- Ankley, G. T., Brooks, B. W., Huggett, D. B., Sumpter, J. P. (2007). Repeating history: pharmaceuticals in the environment. *Environ. Sci. Technol.* 41: 8211–8217
- Aparicio, V. C., Costa, J. L., & Gonzalo Mayoral, E. S. (2017). Plaguicidas en el ambiente. Ediciones INTA, Buenos Aires, Argentina. 156 pp.
- Arman, N. Z., Salmiati, S., Aris, A., Salim, M. R., Nazifa, T. H., Muhamad, M. S., & Marpongahtun, M. (2021). A review on emerging pollutants in the water environment: Existences, health effects and treatment processes. *Water* 13: 3258.
- Asada, K. (1992). Ascorbate peroxidase - a hydrogen peroxide-scavenging enzyme in plants. *Physiol. Plant.* 85: 235-241.
- Asada, K. (1999). The water-water cycle in chloroplasts: scavenging of active oxygens and dissipation of excess photons. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 50: 601-639.
- AySA S.A. (2018). Manual de plantas depuradoras. Vol. 1: caracterización de efluentes: ensayos físicos y químicos. 1a ed. Lazos de Agua. Ciudad Autónoma de Buenos Aires. 82 pp.
- Barceló, D., López, M. J. (2008). Contaminación y calidad química del agua: el problema de los contaminantes emergentes. Jornadas de presentación de resultados: el estado ecológico de las masas de agua. Panel científico-técnico de seguimiento de la política de aguas, Sevilla. Pp: 1-27.
- Bischoff, H.W., Bold H.C. (1963). Phycological Studies IV. Some soil algae from enchanted rock and related algal species. University of Texas Publications 6318: 1-95.
- Blasco, J., Trombini, C. (2023). Ibuprofen and Diclofenac in the marine environment - a critical review of their occurrence and potential risk for invertebrate species. *Water Emerg. Contam. Nanoplastics* 2:14.

Brozinski, J. M., Lahti, M., Meierjohann, A., Oikari, A., & Kronberg, L. (2013). The anti-inflammatory drugs diclofenac, naproxen and ibuprofen are found in the bile of wild fish caught downstream of a wastewater treatment plant. *Environ. Sci. Technol.* 47(1): 342-348.

Buriticá, S M. 2019. Metales pesados, plaguicidas y efectos de los disruptores endocrinos en la salud humana y animal. En: Posada S. (Ed.) *Medicina de la conservación y enfermedades de la fauna silvestre*. Fondo editorial biogénesis. Pp: 73 – 82.

Carlsson, C., Johansson, A. K., Alvan, G., Bergman, K., & Kühler, T. (2006). Are pharmaceuticals potent environmental pollutants?: Part I: Environmental risk assessments of selected active pharmaceutical ingredients. *Sci. Tot. Environ.* 364(1-3): 67-87.

Carusso, S., 2017. Evaluación toxicológica de antibióticos de uso veterinario y sus mezclas binarias en el crecimiento de algas verdes. Tesis de Licenciatura. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad de Buenos Aires. 93 pp.

Cleuvers, M. (2004). Mixture toxicity of the anti-inflammatory drugs diclofenac, ibuprofen, naproxen, and acetylsalicylic acid. *Ecotox. Environ. Saf.* 59(3): 309-315.

De la Torre, F. R. (2001). Estudio integrado de la contaminación acuática mediante bioensayos y parámetros fisiológicos y bioquímicos indicadores de estrés ambiental. Tesis Doctoral. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. https://hdl.handle.net/20.500.12110/tesis_n3405_DelaTorre

DeLorenzo, M. E., Scott, G. I., & Ross, P. E. (2001). Toxicity of pesticides to aquatic microorganisms: a review. *Environ. Toxicol. Chem.* 20(1): 84-98.

De María, N., de Felipe, M. R., Fernández-Pascual, M. (2005). Alterations induced by glyphosate on lupin photosynthetic apparatus and nodule ultrastructure and some oxygen diffusion related proteins. *Plant Physiol. Biochem.* 43 (10-11): 985-996.

De Miguel, Á., Lado, J. J., Martínez, V., Leal, M., & García, R. (2009). El ciclo hidrológico: experiencias prácticas para su comprensión. *Enseñanza de las Ciencias de la Tierra* 17(1): 78-85.

Díaz Báez, M., Y. Pica Granados, and A. Ronco. (2004). Ensayo de toxicidad aguda con el cladóceros *Daphnia magna*. En: G. Castillo Morales (ed.) *Ensayos toxicológicos y métodos de evaluación de calidad de aguas*. IMTA, México. Pp: 52 -63

Diclofenac Prescribing 2023. Diclofenac prescribing information, Medically Reviewed. <https://www.drugs.com/pro/diclofenac.html> (último acceso febrero 2024)

Di Mascio, P., Murphy, M. E., Sies, H. (1991). Antioxidant defense systems: the role of carotenoids, tocopherols, and thiols. *Am. J. Clin. Nutr.* 53(1): 194S-200S.

Doležalová Weissmannová, H., Pavlovský, J., Fišerová, L., Kosarova H. (2018). Toxicity of Diclofenac: Cadmium Binary Mixtures to Algae *Desmodesmus subspicatus* Using Normalization Method. *Bull Environ. Contam. Toxicol.* 101: 205–213.

Elorriaga, Y., Marino, D. J., Carriquiriborde, P., Ronco, A. E. (2013a). Human pharmaceuticals in wastewaters from urbanized areas of Argentina. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 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. *Int. J. Environ. Health.* 6(4): 330-339.

Fassiano, A. V., Ríos de Molina, M. C., Juárez Beatriz, A. (2013). Biomarcadores: Aplicación del estrés oxidativo. Señal de alerta de contaminación ambiental. *Ciencia Hoy* 22: 8-12. <http://www.faba.org.ar/fabainforma/494/ABCL.htm>

Fassiano A., (2016). Toxicodinamia del herbicida Imazetapir en *Scenedesmus vacuolatus* y en una cadena trófica: Efecto de un formulado comercial, sus componentes y la mezcla con glifosato. Tesis de Doctorado. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad de Buenos Aires. 174 pp.

Fassiano, A. V., March, H., Santos, M., Juárez, Á. B., Ríos de Molina M. C. (2022). Toxicological effects of active and inert ingredients of imazethapyr formulation Verosil® against *Scenedesmus vacuolatus* (Chlorophyta). *Environ. Sci. Pollut. Res.* 29: 31384–31399.

Ferrera-Cerrato, R., Rojas-Avelizapa, N. G., Poggi-Varaldo, H. M., Alarcón, A., Cañizares-Villanueva, R.O. (2006). Procesos de biorremediación de suelo y agua contaminados por hidrocarburos del petróleo y otros compuestos orgánicos. *Rev. Latinoam. Microbiol.* 48(2):179-187.

Franklin, N. M., Staube, J. L., Lim, R. P. (2002). Development of flow cytometry-based algal bioassays for assessing toxicity of copper in natural waters. *Environ. Toxicol. Chem.* 20: 160-170

Fodorpataki, L., Bartha, C., Keresztes, Z. G. (2009). Stress-physiological reactions of the green alga *Scenedesmus opoliensis* to water pollution with herbicides. *Analele. Univ. din Oradea Fasc. Biol.* 1: 51-56.

García-Estañ Marín, E. (2019). Optimización de los parámetros de operación en un sistema de tratamiento biológico para la eliminación de compuestos farmacéuticos en aguas residuales urbanas. Diseño de un reactor biológico secuencial para 5000 habitantes equivalentes. Tesis Final de Grado. Escuela Técnica Superior Ingenieros Industriales Valencia. Universitat Politècnica de València. 114 pp.

Giannuzzi, L., Ortega, F., Ventosi, E. G. (2018). Principios generales de la toxicología. En: Gianuzzi L (Ed.) *Toxicología general y aplicada*. Universidad Nacional de La Plata. Pp: 5 – 27.

Gil Arroyo, C. E. (2015). Análisis de fármacos y disruptores endócrinos en peces y moluscos destinados al consumo humano. Tesis de grado en Ciencias Ambientales, Universitat de Girona, España. 37 pp. <https://dugi-doc.udg.edu/handle/10256/11859?show=full>

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). *Environ. Int.* 36(2): 153-162.

Gleick, P. H. (1993). *Water in crisis* (Vol. 100). New York, Oxford University Press. 15 pp.

Gonzalez-Rey, M., Bebianno, M. J. (2014). Effects of non-steroidal anti-inflammatory drug (NSAID) diclofenac exposure in mussel *Mytilus galloprovincialis*. *Aquat. Toxicol.* 148: 221-230.

Harshkova, D., Liakh, I., Bialevich, V., Ondrejmišková, K., Aksmann, A., Bišová, K. (2021). Diclofenac alters the cell cycle progression of the green alga *Chlamydomonas reinhardtii*. *Cells* 10(8): 1936.

Heberer, T. (2002). Occurrence, fate, and removal of pharmaceutical residues in the aquatic environment: a review of recent research data. *Toxicol. Lett.* 131(1-2): 5-17.

Hillebrand, H., Durselen, C., Kirschtel, D., Pollinger, U. (1999). Biovolume calculation for pelagic and benthic microalgae. *J. Phycol.* 35: 403-424.

Hindák, F. (1990). *Studies on the chlorococcal algae (Chlorophyceae)*. V. Slovak Academy of Science, VEDA publishing house, Bratislava, Slovakia.

- Hodges, D. M., Delong, J. M., Forney, C. F., Prange, R. K., (1999). Improving the thiobarbituric acid-reactive- substances assay for estimating lipid peroxidation in plant tissues containing anthocyanin and others interfering compounds. *Planta* 207: 604-611.
- Hoeger, B., Köllner, B., Dietrich, D. R., Hitzfeld, B. (2005). Water-borne diclofenac affects kidney and gill integrity and selected immune parameters in brown trout (*Salmo trutta f. fario*). *Aquat. Toxicol.* 75(1): 53-64.
- Hughes, S. R., Kay, P., Brown, L. E. (2013). Global synthesis and critical evaluation of pharmaceutical data sets collected from river systems. *Environ. Sci. Technol.* 47: 661–677.
- Khan, N. A., Khan, S. U., Ahmed, S., Farooqi, I. H., Yousefi, M., Mohammadi, A. A., Changan, F. (2020). Recent trends in disposal and treatment technologies of emerging pollutants. A critical review. *Trends Anal. Chem.* 122: 115744.
- Krienitz, L., Bock, C., Nozaki, H., Wolf, M. (2011). SSU rRNA gene phylogeny of morphospecies affiliated to the bioassay alga “*Selenastrum capricornutum*” recovered the polyphyletic origin of crescent-shaped Chlorophyta 1. *J. Phycol.* 47(4): 880-893.
- Kohen, R., Nyska, A. (2002). Oxidation of biological systems: oxidative stress phenomena, antioxidants, redox reactions, and methods for their quantification. *Toxicol. Pathol.* 30: 620–650.
- Kowaltowski, A. J., de Souza-Pinto, N. C., Castilho, R. F., Vercesi, A. E. (2009). Mitochondria and reactive oxygen species. *Free Radical Biol. Med.* 47: 333-343
- Lam, P. K. S., Wut, P. F., Chan, A. C. W., Wu, R. S. S. (1999). Individual and combined effects of cadmium and copper on the growth response of *Chlorella vulgaris*. *Environ. Toxicol. Int J.* 14(3): 347-353.
- Lei, A., Hu, Z., Wong, Y., Tam, N. F. (2006). Antioxidant responses of microalgal species to pyrene. *J. Appl. Phycol.* 18: 67-78.
- Levy, J.L., Stauber, J. L., Jolley, D. F. (2007). Sensitivity of marine microalgae to copper: the effect of biotic factors on copper adsorption and toxicity. *Sci. Total. Environ.* 387 (1-3): 141– 154
- Lichtenthaler, H. K. (1987). Chlorophylls and carotenoids: pigments of photosynthetic biomembranes. *Methods Enzymol.* 148: 349-382.

- Li, H., Cheng K. W., Wong, C. C., Fan, K. W., Chen, F., Jiang, Y. (2007). Evaluation of antioxidant capacity and total phenolic content of different fractions of selected microalgae. *Food Chem.* 102: 771-776.
- Llorca, M., Farré, M., Eljarrat, E., Díaz-Cruz, S., Rodríguez-Mozaz, S., Wunderlin, D., Barcelo, D. A. (2017). Review of emerging contaminants in aquatic biota from latin america: 2002–2016. *Environ. Toxicol. Chem.* 36: 1716–1727.
- Lonappan, L., Brar, S. K., Das, R. K., Verma, M., Surampalli, R. Y. (2016). Diclofenac and its transformation products: environmental occurrence and toxicity-a review. *Environ. Int.* 96: 127-138.
- Lummato, M. M., Fassiano, A., Graziano, M., dos Santos Afonso, M., de Molina, M. D. C. R., Juárez, Á. B. (2019). Effect of glyphosate on the growth, morphology, ultrastructure and metabolism of *Scenedesmus vacuolatus*. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 172: 471-479.
- Machado, M. D., Soares, E. V. (2014). Modification of cell volume and proliferative capacity of *Pseudokirchneriella subcapitata* cells exposed to metal stress. *Aquatic Toxicol.* 147: 1-6.
- Machado, M. D., Soares, E. V. (2019). Impact of erythromycin on a non-target organism: Cellular effects on the freshwater microalga *Pseudokirchneriella subcapitata*. *Aquatic Toxicol.* 208: 179-186.
- Magdaleno, A. (2004). Evaluación de la calidad de las aguas del río Matanza-Riachuelo (Buenos Aires, Argentina), mediante estudios limnológicos y bioensayos algales. Tesis de Doctorado. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 222 pp.
- Majewska, M., Harshkova, D., Guściora, 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.
- McCormic, P. V., Cairns, J. (1997). Algal indicators of aquatic ecosystem condition and change. En: Wuncheng, W., Gorsuch, J. W., Hughes, J. S. (eds.) *Plants for environmental studies*. Lewish Publishers. Pp: 177-208.
- Meyen, F. J. F. (1829). Beobachtungen über einige niedere Algenformen. *Nova Acta Phys. Med. Acad. Caes. Leop. Carol. Nat.* 14: 768-778.
- Mir-Tutusaus, J. A., Parladé, E., Llorca, M., Villagrasa, M., Barceló, D., Rodríguez-Mozaz, S., Martínez-Alonso, M., Gaju, N., Caminal, G., Sarrà, M. (2017). Pharmaceuticals removal and

microbial community assessment in a continuous fungal treatment of non-sterile real hospital wastewater after a coagulation-flocculation pretreatment. *Water Res.* 116: 65-75

Moreno-Ortiz, V. C., Martínez-Núñez, J. M., Kravzov-Jinich, J., Pérez-Hernández, L. A., Moreno-Bonett, C., Altagracia-Martínez, M. (2013). Los medicamentos de receta de origen sintético y su impacto en el medio ambiente. *Rev. Mex. Cienc. Farm.* 44(4): 17-29.

Muñoz-Peñuela, M., Lo Nostro, F. L., Gomes, A. D. O., Tolussi, C. E., Branco, G. S., Pinheiro, J. P. S., ... & Moreira, R. G. (2021). Diclofenac and caffeine inhibit hepatic antioxidant enzymes in the freshwater fish *Astyanax altiparanae* (Teleostei: Characiformes). *Comp. Biochem. Physiol.* 240: 108910.

Nyholm, N., Källqvist, T. (1989). Methods for growth inhibition toxicity tests with freshwater algae. *Environ. Toxicol. Chem. Int. J.* 8(8): 689-703.

Nyholm, N., Peterson, H. G. (1997). Laboratory bioassays with microalgae. En: Wang, W., Gorsuch, J. W., Hughes J. S. *Plants for Environmental Studies*. CRC Press, New York. Pp: 226-275.

Oaks, J., Gilbert, M., Virani, M. Richard T. Watson, Carol U. Meteyer, Bruce A. Rideout, Shivaprasad, H. L., Ahmed, S., Chaudhry, M. J. I., Arshad, M., Mahmood, S., Ali, A., Khan, A. A. (2004). Diclofenac residues as the cause of vulture population decline in Pakistan. *Nature*. 427: 630–633. <https://doi.org/10.1038/nature02317>

OECD (2011) OECD guideline for the testing of chemicals. Freshwater alga and cyanobacteria, Growth Inhibition test. Annex 5 corrected. OECD Publications Servic. Paris

OECD. (2012). New and emerging water pollutants arising from agriculture. OECD Publications Service, Paris.

Okamura M. (1980). An improved method for determination of L-ascorbic acid and Ldehydroascorbic acid in blood plasma. *Clin. Chim. Acta* 103: 259-268.

Oropesa, A. L., Moreno, J. J., Gómez, L. J. (2017). Lesiones histopatológicas en peces originadas por la exposición a contaminantes emergentes: recopilando y analizando datos. *Rev. Toxicol.* 34(2): 99-108.

Parlamento Europeo. (2013). Directiva 2013/39/UE. Diario Oficial de la Unión Europea L 226: 1-17.

- Peltzer, P. M., Lajmanovich, R. C., Martinuzzi, C., Attademo, A. M., Curi, L. M., Sandoval, M. T. (2019). Biototoxicity of diclofenac on two larval amphibians: Assessment of development, growth, cardiac function and rhythm, behavior and antioxidant system. *Sci. Total Environ.* 683: 624-637.
- Pérez J. G. (2017). Evaluación de la sensibilidad de cuatro cepas autóctonas de microalgas verdes a una formulación de Glifosato. Tesis de Licenciatura en Ciencias Biológicas. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 79 pp.
- Petrie, B., Barden, R., Kasprzyk-Hordern, B. (2015). A review on emerging contaminants in wastewaters and the environment: current knowledge, understudied areas and recommendations for future monitoring. *Water Res.* 72: 3-27.
- Petrović, M., Gonzalez, S., Barceló, D. (2003). Analysis and removal of emerging contaminants in wastewater and drinking water. *TrAC. Trends Anal. Chem.* 22(10): 685-696.
- PNUD (Programa de las Naciones Unidas para el Desarrollo) (2009). Reducción y Prevención de la contaminación de origen terrestre en el Río de la Plata y su frente Marítimo mediante la implementación del frente estratégico de FREPLATA. Programa de las Naciones Unidas para el Desarrollo. Proyecto ARG/09/G31.
- Puddu A., (1989). Programma di calcolo per l'elaborazione dei risultati di un saggio di tossicità mediante analisi dei probits. *Notiziario IRSA Metodi Analitici per le Acque* 9 (2): 19-37.
- Quigg A., Reinfelder J R., Fisher N.S. (2006). Copper uptake kinetics in diverse marine phytoplankton. *Limnol. Oceanogr.* 51(2): 893-899.
- Quirós, R., Rennella, A. M., Boveri, M. A., Rosso, J. J., Sosnovsky, A. (2002). Factores que afectan la estructura y el funcionamiento de las lagunas pampeanas. *Ecol. Austral* 12(2): 175-185.
- Quirós, R., Rosso, J. J., Rennella, A., Sosnovsky, A., Boveri, M. (2002). Análisis del estado trófico de las lagunas pampeanas (Argentina). *Interciencia* 27(11): 584-591.
- Rai, L. C., Rai, P. K., Mallick, N. (1996). Regulation of heavy metal toxicity in acid- tolerant *Chlorella*: physiological and biochemical approaches. *Environ. Exp. Bot.* 36: 99-109.
- Romero, D. M., Ríos de Molina, M. C., Juárez, A. B. (2011). Oxidative stress induced by a commercial glyphosate formulation in a tolerant strain of *Chlorella kessleri*. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 74(4): 741-747.

Roset, J., Aguayo, S., Muñoz, M. J. (2001). Detección de cianobacterias y sus toxinas. Una revisión. *Rev. Toxicol.* 18(2): 65-71.

Russo, C., Nugnes, R., Orlo, E., di Matteo, A., De Felice, B., Montanino, C., Lavorgna, M., Isidori, M. (2023). Diclofenac eco-geno-toxicity in freshwater algae, rotifers and crustaceans. *Environ. Pollut.* 335: 122251.

Sabatini, S. E., Juárez, A. B., Eppis, M. R., Bianchi, L., Luquet, C. M., Ríos de Molina M. C. (2009) Oxidative stress and antioxidant defenses in two green microalgae exposed to copper. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 72: 1200–1206

Salguero, A., De la Morena, B., Vígara, J., Vega, J. M., Vilchez, C., León, R. (2003). Carotenoids as protective response against oxidative damage in *Dunaliella bardawil*. *Biomol. Eng.* 20: 249-253.

Sánchez Sandoval, D. S. (2021). Influencia de la deficiencia de nutrientes (C, N, P) en la remoción de diclofenaco por las microalgas *Chlorella vulgaris*, *Nannochloropsis oculata*, *Scenedesmus acutus*, *Scenedesmus obliquus*, *Chlamydomonas reinhardtii* CC137 y CC1731. Tesis de Doctorado en Ciencias Químicas. Facultad de Ciencias Químicas. Universidad Autónoma de San Luis Potosí. México. 74 pp.

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.

Santos, C. E. (2017). Biorrelación de aguas contaminadas con nutrientes y fármacos mediante microalgas. Tesis de Doctorado. Universidad de León. España. 178 pp.

Sathishkumar, P., Meena, R. A. A., Palanisami, T., Ashokkumar, V., Palvannan, T., Gu, F. L. (2020). Occurrence, interactive effects and ecological risk of diclofenac in environmental compartments and biota-a review. *Sci. Total. Environ.* 698: 134057.

Schiariti, A., Juárez, A. B., Rodríguez, M. C. (2004). Effects of sublethal concentrations of copper on three strains of green microalgae under autotrophic and mixotrophic culture conditions. *Algol. Stud.* 114 (1): 143–157.

Schmitt-Jansen, M., Bartels, P., Adler, N., Altenburger, R. (2007). Phytotoxicity assessment of diclofenac and its phototransformation products. *Anal. BioanalChem.* 387: 1389-1396

- Schulze, T., Weiss, S., Schymanski, E., Von der Ohe, P. C., Schmitt-Jansen, M., Altenburger, R., Streck, G., Brack, W. (2010). Identification of a phytotoxic photo-transformation product of diclofenac using effect directed analysis. *Environ. Pollut.* 158: 1461–1466.
- Soeder, C. J., Hegewald, E. (1988). *Scenedesmus*. En: Borowjtzka M. A., Borowitzka, L. J. (eds) *Micro-algal biotechnology*. Cambridge. Pp: 59-84.
- Stevenson, R. J., Smol, J. P. (2003). Use of algae in environmental assessments. En: Wehr, J. D., Sheath, R. G., Kocielek, J. P. (eds). *Freshwater algae in North America: classification and ecology*. Pp: 775-804.
- Stohs, S. J., Bagchi, D. (1995) Oxidative mechanisms in the toxicity of metal ions. *Free Radic. Biol. Med.* 18: 321-336.
- Stratton, G. W., Giles, J. (1990). Importance of bioassay volume in toxicity tests using algae and aquatic invertebrates. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 44: 420-427.
- Takara M. (2022). Evaluación toxicológica de los antiinflamatorios ibuprofeno y diclofenac y sus mezclas en el crecimiento de tres cepas de algas verdes. Tesis de Licenciatura en Ciencias Biológicas. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 60 pp.
- Tang, J., Hoagland, K. D., Siegfried, B. D. (1998). Uptake and bioconcentration of atrazine by selected freshwater algae. *Environ. Toxicol. Chem.* 17 (6): 1085-1090
- Teglia, C. M., Peltzer, P. M., Seib, S. N., Lajmanovich, R. C., Culzoni, M. J., Goicochea, H. C. (2017). Simultaneous multi- residue determination of twenty-one veterinary drugs in poultry by modeling three-way liquid chromatography with fluorescence and absorption detection data. *Talanta* 167: 442–452.
- Thomas, K. V., Hilton, M. J. (2004) The occurrence of selected human pharmaceutical compounds in UK estuaries. *Mar. Pollut. Bull.* 49: 436–444
- Tlili, A., Montuelle, B., Bérard, A., Bouchez, A. (2011). Impact of chronic and acute pesticide exposures on periphyton communities. *Sci. Total Environ.* 409(11): 2102–2113.
- Torres, M. A., Barros, M. P., Campos, S. C. G., Pinto, E., Rajamani, S., Sayre, R. T., Colepicolo, P. (2008). Biochemical biomarkers in algae and marine pollution: a review. *Ecotox. Environ. Saf.* 71: 1-15.

- Trentini, A., Groppa, M. D., Zawoznik, M. S., Bigi, R. I., Perelman, P. E., Marconi, P. L. (2017). Biorremediación del lago Lugano de la Ciudad Autónoma de Buenos Aires por algas unicelulares, estudios preliminares. *Revista Terra Mundus* 4(2): 1-12.
- Valavanidis, A., Vlahogianni, T., Dassenakis, M., Scoullos, M. (2006). Molecular biomarkers of oxidative stress in aquatic organisms in relation to toxic environmental pollutants. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 64: 178–189.
- Valdés, M. E., Amé, M. V., Bistoni, M. A., Wunderlin, D. A. (2014). Occurrence and bioaccumulation of pharmaceuticals in a fish species inhabiting the Suquía River basin (Córdoba, Argentina). *Sci. Total Environ.* 472: 389–396
- Vavilin, D. V., Ducruet, J. M., Matorin, D. N., Venediktov, P. S., Rubin, A. B. (1998). Membrane lipid peroxidation, cell viability and Photosystem II activity in the green alga *Chlorella pyrenoidosa* subjected to various stress conditions. *Photochem. Photobiol.* 42: 233-239.
- Vendrell, E., Gomez de Barreda Ferraz, D., Sabater, C., Carrasco, J. M. (2009). Effect of glyphosate on growth of four freshwater species of phytoplankton: a microplate bioassay. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 82: 538-542.
- Venrick, E. L. (1978) How many cells to count? En: Sournia A. (ed) *Phytoplankton Manual, Monographs on Oceanographic Methodology*. UNESCO Press, Paris. Pp:167–180
- Wurtsbaugh, W. A., Paerl, H. W., Dodds, W. K. (2019). Nutrients, eutrophication and harmful algal blooms along the freshwater to marine continuum. *WIREs Water* 6(5): 1-27.
- Yamagishi, T., Yamaguchi, H., Suzuki, S., Horie, Y., Tatarazako, N. (2017). Cell reproductive patterns in the green alga *Pseudokirchneriella subcapitata* (= *Selenastrum capricornutum*) and their variations under exposure to the typical toxicants potassium dichromate and 3,5-DCP. *PLoS ONE* 12(2): e0171259. doi:10.1371/journal.pone.0171259