

EVALUACIÓN ECOTOXICOLÓGICA DE LAS INTERACCIONES ENTRE PARACETAMOL E IBUPROFENO SOBRE LA MICROALGA DE AGUA DULCE *Pseudokirchneriella subcapitata*

Ecotoxicological assessment of the interactions between paracetamol and ibuprofen on the freshwater microalgae *Pseudokirchneriella subcapitata*

Vicente MORAGA¹ y Hernán GAETE^{1,2*}

¹ Escuela de Ingeniería en Medioambiente, Universidad de Valparaíso, Avenida Brasil Número 2140, Valparaíso, Chile.

² Centro de Investigación y Gestión de Recursos Naturales (CIGREN), Universidad de Valparaíso. Avenida Gran Bretaña Número 1111, Playa Ancha, Valparaíso, Chile.

*Autor para correspondencia: hernan.gaete@uv.cl

(Recibido: octubre de 2023; aceptado: noviembre de 2023)

Palabras clave: toxicidad, contaminantes emergentes, fármacos, microalgas.

RESUMEN

Los contaminantes emergentes, tales como fármacos de uso humano y veterinarios, generan creciente preocupación por sus efectos tóxicos potenciales en organismos acuáticos. Los antiinflamatorios paracetamol e ibuprofeno están entre los fármacos más consumidos a nivel mundial y se han encontrado en ecosistemas acuáticos como ríos y lagos. El objetivo de este trabajo fue evaluar la toxicidad de paracetamol e ibuprofeno y sus interacciones sobre la microalga *Pseudokirchneriella subcapitata*. Para ello, se prepararon concentraciones crecientes de ambos compuestos farmacéuticos y se realizaron bioensayos de toxicidad con *P. subcapitata*, en tanto que para las interacciones se prepararon mezclas binarias en proporciones de 4:1, 1:4 y 1:1 de acuerdo con los CI₂₀ determinados previamente. Las interacciones se determinaron de acuerdo con los modelos concentración-adición y proporción-sinergia. Los resultados muestran que la toxicidad del ibuprofeno fue mayor que la de paracetamol (CI₂₀-72 h de 12.7 y 23.9 mg/L, respectivamente). Las interacciones se clasificaron como antagónicas. En conclusión, los resultados sugieren un bajo riesgo ambiental para los productores primarios como la microalga *P. subcapitata*, ya que las concentraciones que provocan efectos tóxicos son superiores a las reportadas en ecosistemas acuáticos naturales como lagos y ríos en diferentes partes del mundo. Por otra parte, la presencia conjunta de ambos fármacos inhibe sus toxicidades individuales sobre *P. subcapitata*.

Key words: toxicity, emerging pollutants, pharmaceuticals, microalgae.

ABSTRACT

Emerging contaminants, such as drugs for human and veterinary use, are of growing concern due to their potential toxic effects on aquatic organisms. The anti-inflammatories paracetamol and ibuprofen are among the most consumed drugs worldwide and have been found in aquatic ecosystems such as rivers and lakes. The aim of this work was to evaluate the toxicity of paracetamol and ibuprofen and their interactions on the microalga *Pseudokirchneriella subcapitata*. For this purpose, increasing concentrations of both

pharmaceutical compounds were prepared, toxicity bioassays were performed with *P. subcapitata*, while for interactions, binary mixtures were prepared in the following ratios: 4:1, 1:4, and 1:1 according to the CI_{20} previously determined. The interactions were determined according to the concentration-addition and synergy-ratio models. The results show that the toxicity of ibuprofen was higher than paracetamol (72-h CI_{20} of 12.7 and 23.9 mg/L, respectively). The interactions were classified as antagonistic. In conclusion, the results suggest a low environmental risk for primary producers such as the microalgae *P. subcapitata*, since the concentrations that cause toxic effects are higher than those reported in natural aquatic ecosystems such as lakes and rivers in different parts of the world. On the other hand, the joint presence of both drugs inhibits their individual toxicities on *P. subcapitata*.

INTRODUCCIÓN

Los contaminantes emergentes tales como fármacos de uso humano y veterinarios, productos de aseo personal, aditivos industriales, esteroideos y hormonas, así como los subproductos para desinfección, son de creciente interés por sus efectos tóxicos potenciales en organismos acuáticos, a los cuales pueden llegar a través de descargas puntuales y difusas (Gómez-Oliván et al. 2014, Williams et al. 2019, Ding et al. 2020, Ángeles-de Paz et al. 2023). La mayoría de estos contaminantes no está regulada por las normas de calidad ambiental (Ramírez-Morales et al. 2022). Estos agentes químicos no son eliminados por los sistemas convencionales de tratamiento actualmente utilizados, descargándose directamente a los cuerpos de agua (Cleuvers 2004, Grujic et al. 2009, Mathias et al. 2018, Ding et al. 2020).

El desarrollo de fármacos y compuestos bioactivos evoluciona rápidamente, y en muchos casos sus mecanismos de acción son nuevos para los sistemas biológicos, de manera que las consecuencias en el ambiente son inciertas. Por estos motivos, la información disponible sobre los impactos potenciales de muchas de estas sustancias es limitada (Ding et al. 2020). En esta nueva generación de contaminantes destacan los antiinflamatorios no esteroideos (AINE), los cuales son usados para tratar diferentes tipos de dolor, tanto agudo como crónico; por lo tanto, también son los más estudiados (He et al. 2017, Ding et al. 2020). Desde hace muchos años es sabido que los AINE actúan periféricamente reduciendo la producción de prostaglandinas, potentes mediadores hiperalgésicos que modulan múltiples sitios a lo largo de la vía nociceptiva e intensifican tanto el proceso de transducción (efecto de sensibilización periférica) como el de transmisión (efecto de sensibilización central) (Burian y Geisslinger 2005).

Los antiinflamatorios paracetamol e ibuprofeno están entre los fármacos más consumidos en Chile, y diversos estudios muestran que provocan efectos tóxicos en organismos acuáticos. Mathias et al. (2018) señalan que el ibuprofeno provoca nefrotoxicidad e inmunosupresión en *Rhamdia quelen*. Asimismo, se ha reportado que genera estrés oxidativo en el pez cebra y la carpa común (Bartoskova et al. 2013, Islas-Flores et al. 2014), provoca daño genético en bivalvos y cladóceros de agua dulce como *Daphnia magna* (Parolini y Binelli 2012, Gómez-Oliván et al. 2014), y produce embriotoxicidad (David y Pancharatna 2009). Kim et al. (2012) reportan que el paracetamol provoca toxicidad aguda en *Daphnia magna* y *Moina macrodrepoda* con una concentración efectiva (CE_{50}) a las 24 h de 53.87 y 109.5 mg/L, respectivamente, en tanto que la sobrevivencia de peces juveniles es afectada a los 95 mg/L.

Para proteger a los organismos que habitan en ecosistemas acuáticos se han establecido normas y/o regulaciones ambientales basadas en concentraciones totales y disueltas máximas de los elementos químicos en forma individual, sin considerar el papel que juegan los factores ambientales. Así, esta aproximación no garantiza la protección de los organismos acuáticos debido a que la toxicidad de los agentes químicos es afectada por factores físicos y químicos como pH, dureza y materia orgánica (Gaete y Chávez 2008). Otro factor que puede afectar la toxicidad individual de un contaminante es la presencia de otros contaminantes, debido a las interacciones que ocurren al mezclarse (sinérgica, antagónica, aditiva) (Ukić et al. 2019). En los últimos años ha habido un creciente interés por estudiar las interacciones entre agentes químicos con el objeto de predecir su impacto sobre los organismos que habitan los ecosistemas acuáticos (Wang et al. 2022). En este sentido, el conocimiento de los efectos ecotoxicológicos de los productos farmacéuticos sobre los productores

primarios de ecosistemas acuáticos, tanto de manera individual como en mezclas, es escaso.

Entre los organismos que pueden estar expuestos a estos agentes químicos están los productores primarios, los cuales son claves en el funcionamiento de los ecosistemas acuáticos (Grzesiuk et al. 2016). Para evaluar el efecto de los agentes químicos sobre los productores primarios en ecosistemas acuáticos se han desarrollado bioensayos de toxicidad, entre ellos el bioensayo con la microalga *Pseudokirchneriella subcapitata*, la cual se caracteriza por su facilidad de cultivo, sensibilidad a los agentes químicos y replicabilidad de los ensayos (Vannini et al. 2011, Magdaleno et al. 2015, Yamagishi et al. 2017).

Los fármacos ibuprofeno y paracetamol pueden estar presentes en las descargas de plantas de tratamiento de aguas residuales domésticas y ser transportados a los ecosistemas acuáticos, donde forman mezclas complejas que pueden generar interacciones que afectan su toxicidad individual. Los efectos adversos sobre las especies no objetivo son evaluados en estudios de laboratorio mediante la determinación de variables respuesta en especies expuestas a concentraciones conocidas de formas puras y de grado analítico de sustancias activas farmacéuticas, desconociéndose el efecto de las formulaciones comerciales. En consideración de lo anterior, es importante determinar el tipo de interacción de estos agentes químicos en sus respectivas formulaciones comerciales (Cleuvers 2004, Sampaio et al. 2020). Esta información es relevante en la determinación de estándares y normas ambientales para la protección de los organismos y el funcionamiento de los ecosistemas acuáticos. En relación con lo anterior, el objetivo general fue evaluar la toxicidad de formulaciones comerciales de la mezcla de paracetamol e ibuprofeno sobre la microalga *P. subcapitata*.

MATERIALES Y MÉTODOS

Los ensayos de toxicidad se realizaron con la microalga unicelular *P. subcapitata*, perteneciente al orden Chlorococcale, clase Chlorophyceae. Es un alga verde con forma de media luna cuyo largo aproximado es de 14 μm . La cepa fue cultivada en el Laboratorio de Ecotoxicología de la Universidad de Valparaíso, de acuerdo con la norma NCh 2706 (INN 2002).

Las soluciones de prueba de los fármacos se realizaron a partir de formulaciones comerciales, preparadas de acuerdo con el porcentaje de ingrediente activo y solubilidad del paracetamol e ibuprofeno (100 y

75 mg/L, respectivamente). Se utilizó un solvente orgánico, el cual permitió una mejor solubilidad. La concentración de éste en las soluciones de prueba fue inferior al 2 % del total de la solución de acuerdo con la norma NCh 2706 (INN 2002).

Primer experimento

El experimento consistió en determinar la toxicidad aguda de cada fármaco en forma individual, para lo cual se realizaron bioensayos de acuerdo con la norma NCh 2706 (INN 2002). Antes del bioensayo se preparó una solución de nutrientes compuesta por cinco soluciones de reserva, las cuales contenían micronutrientes, macronutrientes, Fe-EDTA, elementos traza y NaHCO_3 . Posteriormente la microalga fue inoculada en matraces Erlenmeyer de 500 mL en volumen igual para todas las muestras y a partir de un cultivo de reserva realizado al menos tres días antes para que las microalgas presentes en él estuviesen en fase exponencial de crecimiento. A continuación fueron enriquecidas con una misma concentración de nutrientes para evitar falsos negativos y se añadieron los volúmenes de paracetamol e ibuprofeno para alcanzar las concentraciones de prueba (**Cuadro I**). Por último, se aforaron con agua destilada hasta generar un volumen de 300 mL. Adicionalmente se preparó un testigo que contenía solamente el inóculo de *P. subcapitata*, nutrientes y agua. Cada solución a las distintas concentraciones y el blanco se realizaron por triplicado y se expusieron a luz blanca fría continua con intensidad lumínica de 4608 lux (equivalentes a cuatro tubos fluorescentes de 30 W), manteniendo una temperatura de $23 \pm 2^\circ\text{C}$ y agitando manualmente todos los días. El inóculo inicial fue de 2.6×10^6 cel/mL. A las 72 h se determinó la concentración de inhibición del 20 % de la tasa de crecimiento ($\text{CI}_{20-72\text{ h}}$), ya que el 50 % fue superior a las concentraciones probadas para el paracetamol. Para ello se utilizó el programa Inhibition Concentration (Icp) de la USEPA, en tanto que la determinación de la concentración sin efecto observable (CSEO) y la concentración más baja a la que se observan efectos (CBOE) de cada

CUADRO I. CONCENTRACIONES DE LOS FÁRMACOS PROBADOS EN LOS BIOENSAYOS DE TOXICIDAD CON *P. subcapitata*.

Elementos químicos	Concentraciones crecientes (mg/L)
Paracetamol	1, 25, 50, 75, 100
Ibuprofeno	0.75, 10, 25, 50, 70

compuesto se determinaron a través de la prueba de Dunnett.

Segundo experimento

Para la determinación del tipo de interacción entre fármacos se siguió el trabajo Otítolaju (2002). De acuerdo con los valores de CI_{20-72} h individuales se realizaron ensayos con las mezclas binarias de los fármacos en proporciones de 4:1, 1:1 y 1:4 de sus respectivos CI_{20-72} h (**Cuadro II**). Se prepararon cinco concentraciones crecientes para cada una de las mezclas.

CUADRO II. CONCENTRACIONES CRECIENTES PARA MEZCLAS BINARIAS PROBADAS EN BIOENSAYOS DE TOXICIDAD CON *P. subcapitata*.

Proporción paracetamol:ibuprofeno	Concentraciones probadas (mg/L)
4:1	1, 25, 50, 75, 100
1:1	1, 25, 50, 75, 100
1:4	5, 20, 35, 50, 65

Cálculo de la tasa de crecimiento (k)

Se calculó la tasa de crecimiento para cada cultivo transcurridas 72 h de exposición, a partir de la ecuación 1:

$$k = \frac{\ln N_n - \ln N_0}{t_n} \quad (1)$$

donde t_n es el tiempo transcurrido entre el inicio y el fin del ensayo, N_0 la densidad celular inicial nominal y N_n la densidad celular al final del ensayo.

Cálculo del porcentaje de inhibición del 20 % de la tasa de crecimiento a las 72 h (CI_{20-72} h)

Se calculó el porcentaje de inhibición para cada concentración con respecto al testigo según la ecuación 2:

$$I_{ki} = \frac{k_c - k_i}{k_c} \times 100 \quad (2)$$

donde I_{ki} es el porcentaje de inhibición de la tasa de crecimiento para la concentración i , k_c la tasa de crecimiento promedio para el testigo y K_i la tasa de crecimiento promedio para la concentración i .

Modelo concentración-adición (Otítolaju 2002)

$$CA = \frac{CI_{20} \text{ estimada}}{CI_{20} \text{ experimental de la mezcla}} \quad (3)$$

donde $CA = 1$ indica que el efecto es aditivo, $CA > 1$ que hay sinergia y $CA < 1$ que hay antagonismo.

Modelo proporción-sinergia (PS) (Otítolaju 2002)

$$PS = \frac{CI_{50} \text{ del elemento químico actuando individualmente}}{CI_{50} \text{ de la mezcla}} \quad (4)$$

donde $PS = 1$ indica aditividad, $PS > 1$ indica sinergia y $PS < 1$ indica antagonismo.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En el **Cuadro III** se muestran los valores de CI_{20-72} h para los fármacos evaluados individualmente y las mezclas binarias. El CI_{50} para paracetamol fue superior a la concentración probada más alta, lo que concuerda con Nunes et al. (2014), quienes reportan una concentración efectiva del 50 % (CE_{50}) de paracetamol en *P. subcapitata* de 292.6 mg/L. Se observa que el ibuprofeno presenta casi el doble de toxicidad que el paracetamol, lo cual puede atribuirse a las diferencias en sus estructuras moleculares (derivados arilpropiónicos en el caso del primero y de p-aminofenol en el segundo; Simpson et al. 2011). De manera similar, aunque en peces, Xia et al. (2017) encontraron un efecto tóxico mayor de ibuprofeno que de paracetamol sobre las variables natatorias y la expresión genética neurológica en el pez cebra *Danio rerio*.

CUADRO III. VALORES DE CI_{20-72} h PARA LOS ELEMENTOS QUÍMICOS EVALUADOS INDIVIDUALMENTE Y EN MEZCLAS CON *P. subcapitata*.

Elementos químicos	CI_{20-72} h (mg/L)
Paracetamol	23.9 (15.6-32.0)
Ibuprofeno	12.7 (9.94-15.2)
1:1	52.9 (44.6-61.7)
1:4 (paracetamol:ibuprofeno)	36.7 (32.3-40.9)
4:1 (paracetamol:ibuprofeno)	50.0 (43.5-56.3)

La toxicidad del paracetamol y el ibuprofeno puede deberse a que inducen al estrés oxidativo (lo que ha sido observado en microcrustáceos como *Daphnia magna* y anfípodos como *Hyaella azteca*), afectando algunas biomoléculas como proteínas, membrana lipídica y ADN (Gómez-Oliván et al. 2014). En algas se ha encontrado que reducen la cantidad del precursor de cloroplasto glutamina sintetasa (GS), que cataliza la síntesis de glutamina, un precursor importante para las vías biosintéticas de aminoácidos (Vannini et al. 2011). Palatnik et al. (1999) mostraron

CUADRO IV. VALORES DE CI_{20-72h} (mg/L) ESTIMADA Y EXPERIMENTAL.*

Mezcla paracetamol-ibuprofeno	$CI_{20-72 h}$ estimada (mg/L)	$CI_{20-72 h}$ experimental (mg/L)	CA
1:1	18.3 (12.8-26.3)	52.9 (44.6- 61.7)	0.34
1:4	14.9 (11.1-16.6)	36.7 (32.3- 40.9)	0.41
4:1	21.7 (14.5-28.6)	50.0 (43.5 - 56.3)	0.43

*Los valores de concentración-adición corresponden a los del modelo concentración-adición, el cual indica que si $CA = 1$ el efecto es aditivo, si $CA > 1$ hay sinergia y si $CA < 1$ hay antagonismo.

CUADRO V. VALORES DE $CI_{20-72 h}$ PARA CADA FÁRMACO INDIVIDUAL Y PARA CADA UNA DE SUS MEZCLAS.

Mezcla	$CI_{20-72 h}$ (mg/L)	PS1	PS2
Paracetamol-ibuprofeno		Par Paracetamol	Ibuprofeno
4:1	50.0 (43.5-56.3)	0.47	0.25
1:1	52.9 (44.6-61.7)	0.45	0.24
1:4	36.7 (32.3-40.9)	0.65	0.34

*PS1 y PS2 pertenecen la modelo proporción-sinergia (PS), donde $PS1 = 1$ indica aditividad, mientras que $PS > 1$ indica sinergia y $PS < 1$ antagonismo.

que la GS cloroplástica es particularmente propensa a la degradación en condiciones de estrés oxidativo. En comparación con el presente estudio, Ching-Yee et al. (2015) reportan una menor toxicidad de paracetamol con valores de $CE_{50-96 h}$ de 250 y 91.4 mg/L, a través de las variables respuesta de densidad óptica y concentración de clorofila d, respectivamente, sobre la misma especie. Por otra parte, Geiger et al. (2016) reportan en menor toxicidad del ibuprofeno que el presente estudio, con valores de $CI_{20-96 h}$ de 51.05 mg/L en *Chlorella vulgaris*. Estas diferencias con nuestro estudio pueden deberse a las variables respuestas evaluadas, así como a la variación interespecífica y el tiempo de exposición. Adicionalmente, la mayor toxicidad en el presente estudio podría estar asociada con la utilización de formulaciones comerciales, ya que en algunos fármacos éstas contienen excipientes (coadyuvantes) que podrían aumentar su biodisponibilidad y por lo tanto su toxicidad. Al respecto, Politakis et al. (2018) señalan que el medicamento Buscopan plus (Boehringer Ingelheim, Alemania) contiene butilbromuro de hiosicina y acetaminofeno (n-acetil-para-aminofenol, también conocido como paracetamol) como sustancias activas. En este sentido, se ha reportado que formulaciones comerciales de pesticidas son más tóxicas que el ingrediente activo (Cossi et al. 2020), lo que podría explicar en parte los resultados del presente estudio.

En los Cuadros IV y V se muestran las clasificaciones de las interacciones binarias determinadas a través de los dos modelos. En el caso del modelo concentración-adición se observa que el tipo de interacción es de tipo antagónica, al igual que en el modelo proporción-sinergia. Estos resultados concuerdan con diversos estudios acerca del antagonismo competitivo entre los fármacos estudiados en diferentes organismos (Kenakin 2006), entre los que destaca el de Gómez-Oliván et al. (2014) realizado con *H. azteca* y una mezcla binaria de AINE entre los que se encontraban paracetamol e ibuprofeno. En dicho estudio también se pudo observar que la interacción entre ambos fármacos es de tipo antagónico, al igual que en el trabajo de Varano et al. (2017) con *D. magna*, en el cual se realizaron mezclas binarias con fluoxitina y propanolol, encontrándose mediante el modelo concentración-adición que esta interacción es antagónica. El trabajo de Di Nica et al. (2016) obtuvo resultados similares con *Aliivibrio fischeri* y una mezcla de AINE. Este tipo de interacción antagónica es un comportamiento conocido como antagonismo competitivo entre dos moléculas que tienen similar modo de acción, debido a que los sitios receptores son limitados y dichas moléculas deben competir por el acceso a ellos (Jespersen et al. 2013). Dong et al. (2019) reportaron resultados similares en los tipos de interacción ibuprofeno más azitromicina e ibuprofeno

más triclosán, clasificadas como antagonicas, sobre *Vibrio fischeri*, señalando que los diferentes grupos funcionales de los fármacos estudiados podían afectar las reacciones fisiológicas y bioquímicas de los organismos.

En este estudio, las concentraciones más bajas a las que se observaron cambios significativos en las tasas de crecimiento fue de 1 y 0.75 mg/L para paracetamol e ibuprofeno, respectivamente (Figs. 1 y 2). Bu et al. (2013) reportaron valores de CSEO y CBOE para ibuprofeno de 0.1 y 1 mg/L, respectivamente, sobre *Hydra attenuata*, que son del mismo orden de magnitud que el presente estudio. Por otra parte, en paracetamol, Kim et al. (2012) reportaron una CSEO de 5.72 mg/L en *D. magna*.

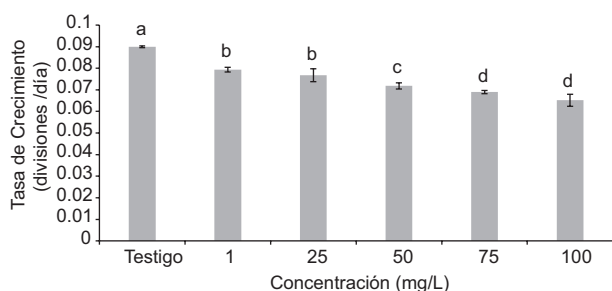


Fig. 1. Comparación de la tasa de crecimiento de *P. subcapitata* con las concentraciones de paracetamol y el testigo. Los valores corresponden al promedio y desviación estándar. Letras diferentes indican diferencias significativas entre tratamientos ($p < 0.05$).

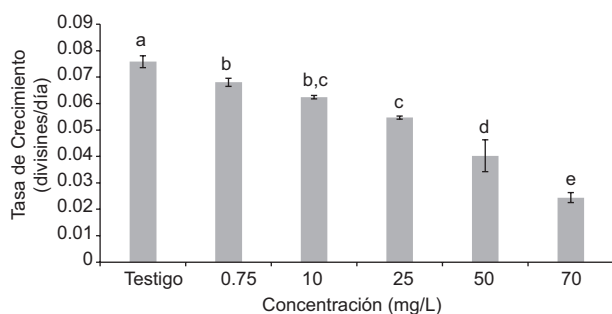


Fig. 2. Comparación de la tasa de crecimiento de *P. subcapitata* con las concentraciones de ibuprofeno y el testigo. Los valores corresponden al promedio y desviación estándar. Letras diferentes indican diferencias significativas entre tratamientos ($p < 0.05$).

CONCLUSIÓN

Al comparar la toxicidad entre fármacos sobre la microalga *P. subcapitata*, el ibuprofeno fue más

tóxico que el paracetamol. El tipo de interacción entre los fármacos estudiados fue antagonico. Estos resultados sugieren un bajo riesgo ambiental para los productores primarios como la microalga *P. subcapitata*, ya que las concentraciones que provocan efectos tóxicos son superiores a las reportadas en ecosistemas acuáticos naturales como lagos y ríos en diferentes partes del mundo. Finalmente, este estudio destaca la importancia de realizar estudios ecotoxicológicos de interacción entre contaminantes emergentes, debido a que estudios de toxicidad de agentes químicos individuales podrían sobreestimar o subestimar su riesgo ambiental.

AGRADECIMIENTOS

Al Centro de Investigación y Gestión de Recursos Naturales (CIGREN) de la Universidad de Valparaíso. A la Profesora Mg. Karina Bel Paredes por la revisión crítica del manuscrito.

REFERENCIAS

- Ángeles-de Paz G., Ledezma-Villanueva A., Robledo-Mahon T., Pozo C., Calvo C., Aranda E. y Purswani J. (2023). Assembled mixed co-cultures for emerging pollutant removal using native microorganisms from sewage sludge. *Chemosphere* 13, 137472. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2022.137472>
- Bartoskova M., Dobsikova R., Stancova V., Zivna D., Blahova J., Marsalek P., Zelnickova L, Bartos M., Casuscelli di Tocco F. y Faggio C. (2013). Evaluation of ibuprofen toxicity for zebrafish (*Danio rerio*) targeting on selected biomarkers of oxidative stress. *Neuroendocrinology Letters* 34 (Suppl 2), 102-108.
- Burian M. y Geisslinger G. (2005). COX-dependent mechanisms involved in the antinociceptive action of NSAIDs at central and peripheral sites. *Pharmacology and Therapeutics* 107 (2), 139-154. <https://doi.org/10.1016/j.pharmthera.2005.02.004>
- Bu Q., Wang B., Huang J., Deng S. y Yu G. (2013). Pharmaceuticals and personal care products in the aquatic environment in China: A review. *Journal of Hazardous Materials* 262, 189-211. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2013.08.040>
- Ching-Yee D., Chu W. y Kok Y. (2015). Assessment of paracetamol (acetaminophen) toxicity in microalgae. *Polish Journal of Environmental Studies* 24 (2), 735-741.
- Cleuvers M. (2003). Aquatic ecotoxicity of pharmaceuticals including the assessment of combination effects.

- Toxicology Letters 142 (3), 185-194. [https://doi.org/10.1016/S0378-4274\(03\)00068-7](https://doi.org/10.1016/S0378-4274(03)00068-7)
- Cossi P., Herbert L., Yusseppone M., Pérez A. y Kristoff G. (2020). Toxicity evaluation of the active ingredient acetamiprid and a commercial formulation (Assail® 70) on the non-target gastropod *Biomphalaria straminea* (Mollusca: Planorbidae). *Ecotoxicology and Environmental Safety* 192, 110248. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2020.110248>
- David A. y Pancharatna K. (2009). Effects of acetaminophen (paracetamol) in the embryonic development of zebrafish, *Danio rerio*. *Journal of Applied Toxicology* 29 (7), 597-602. <https://doi.org/10.1002/jat.1446>
- Ding R., Liu S., He C. y Nie X. (2020). Paracetamol affects the expression of detoxification- and reproduction-related genes and alters the life traits of *Daphnia magna*. *Ecotoxicology* 29, 398-406. <https://doi.org/10.1007/s10646-020-02199-z>
- Di Nica V., Villa S. y Finizio A. (2017). Toxicity of individual pharmaceuticals and their mixtures to *Aliivibrio fischeri*: Experimental results for single compounds and considerations of their mechanisms of action and potential acute effects on aquatic organisms. *Environmental Toxicology and Chemistry* 36 (3), 807-814. <https://doi.org/10.1002/etc.3568>
- Dong Y., Fang Z., Xu Y., Wang Q. y Zou X. 2019. The toxic effects of three active pharmaceutical ingredients (APIs) with different efficacy to *Vibrio fischeri*. *Emerging Contaminants* 5, 297-302. <https://doi.org/10.1016/j.emcon.2019.08.004>
- Geiger E., Hornek-Gausterer R. y Türker M. (2016). Ecotoxicology and environmental safety single and mixture toxicity of pharmaceuticals and chlorophenols to freshwater algae *Chlorella vulgaris*. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 129, 189-198. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2016.03.032>
- Gómez-Oliván L., Neri-Cruz N., Galar-Martínez M., Islas-Flores H. y García-Medina S. (2014). Binary mixtures of diclofenac with paracetamol, ibuprofen, naproxen, and acetylsalicylic acid and these pharmaceuticals in isolated form induce oxidative stress on *Hyalella Azteca*. *Environmental Monitoring and Assessment* 186, 7259-7271. <https://doi.org/10.1007/s10661-014-3925-0>
- Grujic S., Vasiljevic T. y Lausevic M. (2009). Determination of multiple pharmaceutical classes in surface and ground waters by liquid chromatography – ion trap – tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography A* 1216, 4989-5000. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2009.04.059>
- Gaete H. y Chávez C. (2008). Evaluación de la toxicidad de mezclas binarias de cobre, cinc arsénico sobre *Daphnia obtusa* (Kurz, 1874) (Cladocera, Crustacea). *Limnetica* 27 (1), 1-10. <https://doi.org/10.23818/limn.27.01>
- Grzesiuk M. (2016). Photosynthetic sensitivity of phytoplankton to commonly used pharmaceuticals and its dependence on cellular phosphorus status. *Ecotoxicology* 25 (4), 697-707. <https://doi.org/10.1007/s10646-016-1628-8>
- He B., Wang J., Liu J. y Hu X. (2017). Chemosphere Ecopharmacovigilance of non-steroidal anti-inflammatory drugs: Necessity and opportunities. *Chemosphere* 181, 178-189. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2017.04.084>
- INN (2002). Calidad de agua. Bioensayo de inhibición de crecimiento de algas en agua dulce con *Selenastrum capricornutum*. Norma Chilena 2706. Instituto Nacional de Normalización, Santiago, Chile, 28 pp.
- Islas-Flores H., Gómez-Oliván L.M., Galar-Martínez M., García-Medina S., Neri-Cruz N. y Dublán-García O. (2014). Effect of ibuprofen exposure on blood, gill, liver, and brain on common carp (*Cyprinus carpio*) using oxidative stress biomarkers. *Environmental Science and Pollution Research* 21, 5157-5166. <https://doi.org/10.1007/s11356-013-2477-0>
- Jespersen A., Tajima N., Fernández-Cuervo G., Garnier-Amblard E.C. y Furukawa H. (2013). Article structural insights into competitive antagonism in NMDA receptors. *Neuron* 81, 366-378. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2013.11.033>
- Kenakin T. (2006). Collateral efficacy as a pharmacological problem applied to new drug discovery. *Expert Opinion on Drug Discovery* 1 (7), 635-652. <https://doi.org/10.1517/17460441.1.7.635>
- Kim P., Park Y., Ji K., Seo J., Lee S., Choi K., Kho Y., Park J. y Choi K. (2012). Effect of chronic exposure to acetaminophen and lincomycin on Japanese medaka (*Oryzias latipes*) and freshwater cladocerans *Daphnia magna* and *Moina macrocopa*, and potential mechanisms of endocrine disruption. *Chemosphere* 89 (1), 10-18. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2012.04.006>
- Magdaleno A., Sáenz M.E., Juárez A.B. y Moretton J. (2015). Ecotoxicology and environmental safety effects of six antibiotics and their binary mixtures on growth of *P. subcapitata*. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 113, 72-78. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2014.11.021>
- Mathias F.T., Fockink D., Disner G., Prodocimo V., Coelho J., Pereira L., Margarete M. y Silva de Assis H. (2018). Effects of low concentrations of ibuprofen on freshwater fish *Rhamdia quelen*. *Environmental Toxicology and Pharmacology* 59, 105-113. <https://doi.org/10.1016/j.etap.2018.03.008>
- Nunes B., Antunes S.C., Santos J., Martins L. y Castro B.B. (2014). Toxic potential of paracetamol to freshwater organisms: A headache to environmental regulators? *Ecotoxicology and Environmental Safety* 107, 178-185. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2014.05.027>

- Otitoloju A.A. (2002). Evaluation of the joint-action toxicity of binary mixtures of heavy metals against the mangrove periwinkle *Tympanotonus fuscatus* var *radula* (L.). *Ecotoxicology and Environmental Safety* 53 (3), 404-415. [https://doi.org/10.1016/S0147-6513\(02\)00032-5](https://doi.org/10.1016/S0147-6513(02)00032-5)
- Palatnik J., Carrillo N. y Valle E.M. (1999). The role of photosynthetic electron transport in the oxidative degradation of chloroplastic glutamine synthetase. *Plant Physiology* 121 (2), 471-478. <https://doi.org/10.1104/pp.121.2.471>
- Politakis N., Belavgeni A., Efthimiou I., Charalampous N., Kourkouta C. y Dailianis S. (2018). The impact of expired commercial drugs on non-target marine species: A case study with the use of a battery of biomarkers in hemocytes of mussels. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 148, 160-168. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2017.10.021>
- Parolini M. y Binelli A. (2012). Sub-lethal effects induced by a mixture of three non-steroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs) on the freshwater bivalve *Dreissena polymorpha*. *Ecotoxicology* 21, 379-392. <https://doi.org/10.1007/s10646-011-0799-6>
- Ramírez-Morales D., Fajardo-Romero D., Rodríguez-Rodríguez C.E. y Cedergreen N. (2022). Single and mixture toxicity of selected pharmaceuticals to the aquatic macrophyte *Lemna minor*. *Ecotoxicology* 31, 714-724. <https://doi.org/10.1007/s10646-022-02537-3>
- Sampaio R., de Souza Santos L.V., d'Auriol M., Rocha Y.A., Moreira V. y Lange L.C. (2020) Diazepam, metformin, omeprazole and simvastatin: A full discussion of individual and mixture acute toxicity. *Ecotoxicology* 29, 1062-1071. <https://doi.org/10.1007/s10646-020-02239-8>
- Simpson M., Drum M., Nusstein J., Reader A. y Beck M. (2011). Effect of combination of preoperative ibuprofen/acetaminophen on the success of the inferior alveolar nerve block in patients with symptomatic irreversible pulpitis. *Journal of Endodontics* 37 (5), 593-597. <https://doi.org/10.1016/j.joen.2011.02.015>
- Ukića S., Sigurnjaka M., Cvetnića M., Markića M., Novak M., Rogošića M., Rasulevb B., Lončarić A., Kušića H. y Bolanča T. (2019). Toxicity of pharmaceuticals in binary mixtures: Assessment by additive and non-additive toxicity models. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 185, 109-696. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2019.109696>
- Vannini C., Domingo G., Marsoni M., Mattia F. De Labra M., Castiglioni S. y Bracale M. (2011). Effects of a complex mixture of therapeutic drugs on unicellular algae *P. subcapitata*. *Aquatic Toxicology* 101 (2), 459-465. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2010.10.011>
- Varano V., Fabbri E. y Pasteris A. (2017). Assessing the environmental hazard of individual and combined pharmaceuticals: Acute and chronic toxicity of fluoxetine and propranolol in the crustacean *Daphnia magna*. *Ecotoxicology* 26, 711-728. <https://doi.org/10.1007/s10646-017-1803-6>
- Wang Z., Zhang F. y Wang D-G. (2022). Predicting joint toxicity of chemicals by incorporating a weighted descriptor into a mixture model: Cases for binary antibiotics and binary nanoparticles. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 236, 113-472. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2022.113472>
- Williams M., Kookana R.S., Mehta A., Yadav S.K., Tailor B.L. y Maheshwari B. (2019). Emerging contaminants in a river receiving untreated wastewater from an Indian urban centre. *Science of The Total Environment* 647, 1256-1265. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2018.08.084>
- Xia L., Zheng L. y Zhou J. (2017). Effects of ibuprofen, diclofenac and paracetamol on hatch and motor behavior in developing zebrafish (*Danio rerio*). *Chemosphere* 182, 416-425. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2017.05.054>
- Yamagishi T., Horie Y. y Tatarazako N. (2017). Chemosphere synergism between macrolide antibiotics and the azole fungicide ketoconazole in growth inhibition testing of the green alga *P. subcapitata*. *Chemosphere* 174, 1-7. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2017.01.071>