



# Universidad Autónoma de San Luis Potosí

---

---

Facultad de Ciencias Químicas  
Programa de Posgrado en Ciencias Químicas

“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 que para obtener el grado de:  
Doctora en Ciencias Químicas

Presenta

M. T. A. Danaé Samara Sánchez Sandoval

Director de Tesis:

Dra. Ruth Elena Soria Guerra

Co-director:

Dr. Ramón Fernando García de la Cruz



San Luis Potosí, S. L. P. México

Junio de 2021

Proyecto realizado en:

El Laboratorio de Biotecnología Molecular de Células Vegetales y el Laboratorio de Bioquímica Vegetal de la Unidad de Biotecnología de Plantas de la Facultad de Ciencias Químicas de la Universidad Autónoma de San Luis Potosí.

El programa de Doctorado en Ciencias Químicas de la Universidad Autónoma de San Luis Potosí pertenece al Programa Nacional de Posgrados de Calidad (PNPC) del CONACyT, registro 00519, en el nivel Consolidado.

Número de registro de la beca otorgada por CONACyT: 252858



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 por Danaé Samara Sánchez Sandoval se distribuye bajo una [Licencia Creative Commons Atribución-NoComercial 4.0 Internacional](https://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/).



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE SAN LUIS POTOSÍ  
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS  
PROGRAMA DE POSGRADO EN CIENCIAS QUÍMICAS



“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 que para obtener el grado de:  
DOCTOR EN CIENCIAS QUÍMICAS

Presenta

M. T. A. DANAÉ SAMARA SÁNCHEZ SANDOVAL

SINODALES

DRA. RUTH ELENA SORIA GUERRA

---

DR. RAMÓN FERNANDO GARCÍA DE LA CRUZ.

---

DRA. MA. CATALINA ALFARO DE LA TORRE

---

DR. OMAR GONZÁLEZ ORTEGA

---

DR. JOSÉ FRANCISCO MORALES DOMÍNGUEZ

---

### **Integrantes del subcomité de tesis:**

Dra. Ruth Elena Soria Guerra: Director de Tesis. Adscrita al PCQ en la Facultad de Ciencias Químicas de la UASLP, S. L. P.

Dr. Ramón Fernando García de la Cruz: Co-director de Tesis. Adscrito al PCQ en la Facultad de Ciencias Químicas de la UASLP, S. L. P.

Dra. Ma. Catalina Alfaro de la Torre: Asesor de Tesis. Adscrita al PCQ en la Facultad de Ciencias Químicas de la UASLP, S. L. P.

Dr. Omar González Ortega. Asesor de Tesis. Adscrito al PCIQ en la Facultad de Ciencias Químicas de la UASLP, S. L. P.

Dr. José Francisco Morales Domínguez: Asesor Externo. Adscrito al Departamento de Química del Centro de Ciencias Básicas de la Universidad Autónoma de Aguascalientes.

## Agradecimientos

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por la beca que me brindó durante los cuatro años del desarrollo de mi trabajo de doctorado.

A la Doctora Ruth Elena Soria Guerra, directora de este proyecto, por darme la oportunidad de trabajar en su área de investigación, por su apoyo y orientación en el desarrollo y conclusión de este trabajo de tesis. Sin su apoyo nada de esto hubiese sido posible.

Al Doctor Ramón Fernando García de la Cruz, co-director de este proyecto, por su apoyo, asesoría y recomendaciones para la elaboración del proyecto y la tesis.

A los miembros de mi comité, la Doctora María Catalina Alfaro de la Torre y al Doctor José Francisco Morales Domínguez, por sus observaciones y comentarios que enriquecieron este proyecto.

A la Doctora Luz María Teresita Paz Maldonado del Laboratorio de Ingeniería de Birreactores y al Doctor Omar González Ortega del Laboratorio de Bioseparaciones, por permitirnos usar sus equipos para los análisis requeridos en este proyecto.

Al Doctor Roberto Rico Martínez de la UAA, por proporcionarnos las microalgas utilizadas en este proyecto.

A todos mis compañeros del Laboratorio de Biotecnología Molecular de la UASLP, por todo el apoyo que me brindaron en el desarrollo de mi proyecto, porque siempre estaban dispuestos a explicarme el funcionamiento de algún equipo o despejar mis dudas, en especial a la Doctora Luzmila y a la Doctora Erika.

A mis compañeros del posgrado, en especial a Ana, Carmen, Chucho, Rodrigo y Xitlalic quienes me ayudaron a adaptarme, a despejar dudas y apoyarme en las materias cursadas.

*“Ganamos fuerza, coraje y confianza por cada experiencia en la que realmente nos paramos a mirar el miedo a la cara. Debemos hacer lo que creemos que no podemos”*

Eleanor Roosevelt

## DEDICATORIAS

A Dios:

Por no abandonarme y haberme dado la fuerza para lograr este objetivo.

A mi hija **Ketziah Giovanna**:

Por ser la personita más importante en mi vida y por llenar mis días de amor y alegría. Porque por ti deseo ser mejor persona y por ti fue que no me rendí, aún en los momentos más difíciles, al tenerte a mi lado me diste el valor para continuar.

**Te amo mi hermosa Princesa.**

A mi esposo Adrián:

Por darme tu apoyo para iniciar y concluir esta etapa, por ayudarme a entender que puedo con esto y con mucho más, que soy lo suficientemente fuerte y capaz para seguir y que mientras yo lo deseo, lo puedo lograr. Te amo.

A mis papas y hermanos:

Por estar conmigo en todo momento impulsándome, porque sin importar nada, nunca me han dejado sola y sé que nunca lo harán. Gracias por creer en mí, incluso cuando ni yo creía. Los amo.

A mis amigos:

Ana, Carmen, Julieta, Marcos, Saraí y Xochitl, porque sin saberlo, se convirtieron en personas muy importantes para mí. Fueron un apoyo no solo en mi estancia en el doctorado, sino en mi vida. Más que compañeros, se convirtieron en mis amigos. Gracias por darme ánimos en todo momento.

## RESUMEN

El diclofenaco es un medicamento antiinflamatorio no esteroideo que posee actividad analgésica y antipirética. Su desecho en las aguas residuales provoca alteraciones en el medio ambiente, principalmente en sistemas acuíferos alterando procesos biológicos de aves, peces e insectos. Para la eliminación de diclofenaco, en este trabajo se propone el uso de microalgas que se han probado como una herramienta prometedora para eliminar fármacos en el agua. En esta investigación se evaluó la eficiencia de remoción de diclofenaco por seis especies de microalgas: *Chlorella vulgaris* OW-01, *Nannochloropsis oculata* CCAP849/7, *Scenedesmus acutus* UTEX72, *Scenedesmus obliquus* CCAP276/2 y *Chlamydomonas reinhardtii* CC137 y CC1731, además de analizar la degradación del fármaco por la luz. Los resultados mostraron una remoción de diclofenaco del 43 a 91%. El porcentaje de diclofenaco adsorbido en la pared celular osciló entre 16 y 25%, mientras que el porcentaje degradado por fotólisis fue de 15 a 28%. Los resultados indican que *S. obliquus* es la microalga que presentó una mayor eficiencia de remoción de diclofenaco (79 a 91%).

**Palabras clave** Adsorción, Contaminantes emergentes, Fármacos, Fitorremediación, Fotodegradación.

## ABSTRACT

Diclofenac is a non-steroidal anti-inflammatory drug that has analgesic and antipyretic activity. Its disposal in wastewater causes alterations in the environment, mainly in aquifer systems, altering the biological processes of birds, fish and insects. For the removal of diclofenac, this work proposes the use of microalgae that have proven to be promising tools to eliminate drugs in water. In this research, the removal efficiency of diclofenac was evaluated by six species of microalgae: *Chlorella vulgaris* OW-01, *Nannochloropsis oculata* CCAP849/7, *Scenedesmus acutus* UTEX72, *Scenedesmus obliquus* CCAP276/2, and *Chlamydomonas reinhardtii* CC137 and CC1731, in addition to analyzing the degradation of the drug by light. The results showed a diclofenac removal from 43 to 91%. The percentage of diclofenac adsorbed on the cell wall ranged between 16 and 25%, while the percentage degraded by photolysis was 15 to 28%. The results indicate that *S. obliquus* was the microalga that presented a higher diclofenac removal efficiency (79 to 91%).

**Keywords** Emerging contaminants, Pharmaceuticals, Phycoremediation, Adsorption, Photodegradation.

## ÍNDICE DE CONTENIDO

|   |    |
|---|----|
| CAPITULO I .....  | 11 |
| 1. INTRODUCCIÓN.....  | 11 |
| 1.1. CONTAMINANTES EMERGENTES.....  | 13 |
| 1.1.1. Diclofenaco (DCF) .....  | 16 |
| 1.2. TRATAMIENTOS PARA LA ELIMINACIÓN DE CONTAMINANTES EMERGENTES<br>.....    | 18 |
| 1.3. FICORREMEDIACIÓN .....   | 21 |
| 1.4. MICROALGAS.....  | 22 |
| 1.4.1. Cultivo de microalgas .....  | 23 |
| 1.4.1.1. Nutrientes y su función.....   | 23 |
| 1.4.1.2. pH.....  | 25 |
| 1.4.1.3. Temperatura.....   | 26 |
| 1.4.1.4. Luz y agitación .....  | 26 |
| 1.4.2. Mecanismos de remoción de sustancias atribuidos a las microalgas ..... | 27 |
| 1.4.3. Material biológico.....  | 30 |
| 1.4.3.1. <i>Chlorella vulgaris</i> .....                                      | 30 |
| 1.4.3.2. <i>Nannochloropsis oculata</i> .....                                 | 31 |
| 1.4.3.3. <i>Scenedesmus acutus y obliquus</i> .....                           | 32 |
| 1.4.3.4. <i>Chlamydomonas reinhardtii</i> .....                               | 33 |
| 1.5. ANTECEDENTES .....   | 35 |
| CAPITULO II.....  | 37 |
| 2.1. JUSTIFICACIÓN .....  | 37 |
| 2.2. HIPÓTESIS .....  | 38 |
| 2.3. OBJETIVO GENERAL .....   | 38 |
| 2.3.1. Objetivos específicos.....   | 38 |
| CAPITULO III.....   | 39 |
| 3. METODOLOGÍA.....   | 39 |
| 3.1. CULTIVO DE MICROALGAS .....  | 40 |
| 3.2. DISEÑO EXPERIMENTAL .....  | 42 |

|   |    |
|---|----|
| 3.3. PROPAGACIÓN DE LAS MICROALGAS A DIFERENTES CONCENTRACIONES DE NITRÓGENO, FÓSFORO Y CARBONO. .... | 44 |
| 3.4. PREPARACIÓN DE SOLUCIONES STOCK DE DICLOFENACO .....   | 45 |
| 3.5. EVALUACIÓN DEL EFECTO DEL DICLOFENACO EN EL CRECIMIENTO DE LAS MICROALGAS .....                  | 45 |
| 3.6. CINÉTICAS DE CRECIMIENTO Y CUANTIFICACIÓN DE CLOROFILA A .....                                   | 46 |
| 3.7. ANÁLISIS POR HPLC PARA EVALUAR LA REMOCIÓN DE FÁRMACOS .....                                     | 48 |
| 3.8. DETERMINACIÓN DEL MECANISMO DE REMOCIÓN .....  | 49 |
| 3.8.1. Desorción de la pared celular .....  | 49 |
| 3.9. DEGRADACION DEL DICLOFENACO POR FOTÓLISIS .....  | 50 |
| 3.10. ANÁLISIS ESTADÍSTICO .....  | 50 |
| CAPITULO V .....  | 52 |
| 5.1. CONCLUSIONES.....  | 52 |
| CAPITULO VI .....   | 54 |
| 6.1. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS.....  | 54 |
| GLOSARIO .....  | 71 |

## **ÍNDICE DE FIGURAS**

|   |    |
|---|----|
| <b>Figura 1.</b> Contaminación de aguas residuales por productos farmacéuticos .....  | 14 |
| <b>Figura 2.</b> Estructura química del diclofenaco .....   | 17 |
| <b>Figura 3.</b> <i>Chlorella vulgaris</i> .....  | 31 |
| <b>Figura 4.</b> <i>Nannochloropsis oculata</i> .....   | 32 |
| <b>Figura 5.</b> Especies del género <i>Scenedesmus</i> .....   | 33 |
| <b>Figura 6.</b> <i>Chlamydomonas reinhardtii</i> .....   | 35 |
| <b>Figura 7.</b> Diagrama de flujo de la metodología para la remoción de diclofenaco por 6 diferentes cepas de microalgas ..... | 39 |
| <b>Figura 8.</b> Sistema de cultivo de microalgas.....  | 43 |

## **INDICE DE TABLAS**

|  |    |
|--|----|
| <b>Tabla 1.</b> Presencia de productos farmacéuticos en organismos acuáticos.....  | 15 |
| <b>Tabla 2.</b> Propiedades del diclofenaco.....   | 17 |
| <b>Tabla 3.</b> Remoción de antiinflamatorios no esteroideos por diferentes tratamientos .....   | 20 |
| <b>Tabla 4.</b> Composición de la solución nutritiva TAP (Tris-Acetato-Fosfato) .....  | 40 |
| <b>Tabla 5.</b> Composición de la solución nutritiva Bold .....  | 41 |
| <b>Tabla 6.</b> Concentración de los nutrientes (C, N, P) en los medios de cultivo sin modificar ....  | 42 |
| <b>Tabla 7.</b> Diseño experimental de las diferentes concentraciones expresadas en porcentaje para cada nutriente .....   | 42 |
| <b>Tabla 8.</b> Diseño experimental completo de las diferentes concentraciones de cada nutriente (C, N, P) por microalga para <i>C. vulgaris</i> , <i>N. oculata</i> , <i>S. acutus</i> y <i>S. obliquus</i> ..... | 43 |
| <b>Tabla 9.</b> Concentraciones establecidas de diclofenaco para evaluar su efecto en el crecimiento de las microalgas.....  | 46 |

## CAPITULO I

### 1. INTRODUCCIÓN

Uno de los mayores retos en el mundo es contar con una cantidad ilimitada de agua no contaminada y aprovechable para diferentes usos (Carmona, 2012). Uno de los impactos medioambientales más negativos que ha generado el crecimiento de la población en las últimas décadas ha sido la contaminación de los cuerpos de aguas superficiales o subterráneas por la descarga de aguas residuales, las cuales contienen metales traza, contaminantes orgánicos y productos farmacéuticos (entre otros) provenientes de descargas de efluentes domésticos e industriales en cuerpos receptores (Morales, 2012).

La investigación sobre la contaminación de cuerpos de agua se ha centrado en contaminantes convencionales como bifenilos policlorados, dioxinas y pesticidas, mientras que los contaminantes emergentes (CE), como son los productos de cuidado personal, y farmacéuticos, no se habían considerado importantes hasta hace pocos años, siendo que éstos representan una forma de contaminación a través de descargas domésticas con impacto en los organismos acuáticos (Ternes *et al.*, 2004).

Los productos farmacéuticos no eran considerados contaminantes ambientales dado que se desconocía su acumulación o la de sus productos de transformación en suelos, aguas, aire, plantas y animales. Por lo anterior, la concentración de éstos en matrices ambientales y en especial en los cuerpos de agua es indeterminada y solo a partir de los años noventa se comenzó a cuantificar en aguas detectándose concentraciones en partes por billón (ppb) y partes por trillón (ppt). En diversas publicaciones se reporta que en países como España, Italia, Alemania, Canadá, Brasil, Grecia y Francia hay descargas al agua de aproximadamente 500 toneladas de analgésicos por año, en donde el diclofenaco ha alcanzado concentraciones de  $3.02 \mu\text{g L}^{-1}$  (Heberer, 2002). En México, Robledo *et al.* (2017) reportaron concentraciones de fármacos en rangos de 0.2 a  $136 \mu\text{g L}^{-1}$  en influentes y efluentes de la planta de tratamiento de aguas residuales de Morelia.

Se ha demostrado que un gran número de antiinflamatorios de naturaleza no esteroidea son capaces de alterar el sistema endocrino, bloqueando o perturbando las funciones hormonales de diferentes especies de peces, provocando la feminización y hermafroditismo, disminución de la fertilidad y eficacia del apareamiento, incluso pueden incrementar la incidencia de diferentes tipos de cáncer (Farré *et al.*, 2008; Bolong *et al.*, 2009).

Varios estudios han demostrado que el diclofenaco (DCF) es el fármaco mayormente detectado en el medio ambiente (Aus der Beek *et al.*, 2016; Ebele *et al.*, 2017; He *et al.*, 2017; Bonnefille *et al.*, 2018). Además, de otros antiinflamatorios no esteroideos (AINEs), el DCF contiene el mayor nivel de toxicidad aguda (Cleuvers, 2003; Sharma y Kaushik, 2017) en diferentes niveles de la cadena trófica (He *et al.*, 2017).

Los procesos convencionales con los que operan las plantas de tratamiento de aguas residuales, especialmente los de tipo biológico, son ineficientes en la remoción de sustancias como los fármacos.

Una alta proporción de estos compuestos entran al medio acuático, alterando acuíferos y sistemas fluviales y marinos entre otros (Dougherty *et al.*, 2010). Por este motivo, se hace necesaria la evaluación y optimización de tratamientos más eficaces que los procesos convencionales, como la ficorremediación.

La ficorremediación es el uso de macroalgas o microalgas en el tratamiento de aguas residuales que ha ganado gran interés en los últimos años. Hay algunos estudios con diferentes especies de microalgas centrados en la eliminación de contaminantes, incluidos el nitrógeno y el fósforo (Martínez *et al.*, 2000; Ruiz-Marin, Mendoza-Espinosa y Stepherson, 2010), metales pesados (Zhou *et al.*, 2012), disruptores endocrinos, productos farmacéuticos y productos para el cuidado personal (Liu *et al.*, 2010; Zhou *et al.*, 2013).

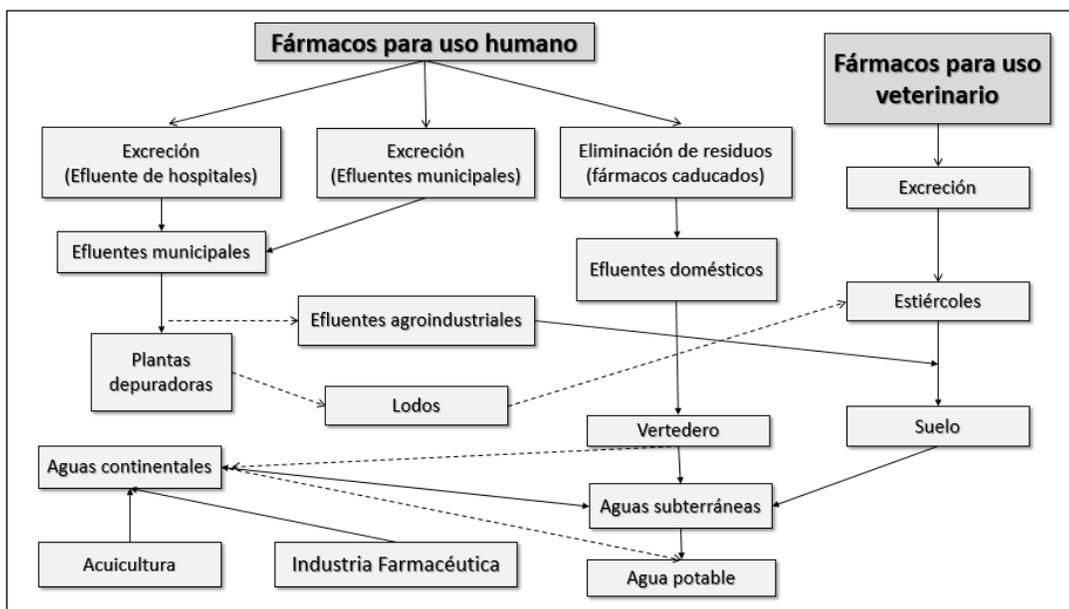
## 1.1. CONTAMINANTES EMERGENTES

Los contaminantes emergentes comprenden una amplia gama de compuestos químicos, entre ellos cabe destacar los fármacos, productos de cuidado personal, hormonas, y pesticidas (Corbacho, 2018).

Los fármacos son considerados como contaminantes emergentes (CE). Es decir, son contaminantes cuya presencia en el medio ambiente no es necesariamente nueva, pero sí la preocupación por sus posibles consecuencias. Se sabe relativamente poco acerca de su presencia e impacto en los distintos compartimentos ambientales. Además, la disponibilidad de métodos para su análisis es limitada y costosa (Pérez, 2016). Otra particularidad de estos compuestos se debe a su elevada producción y consumo con la subsecuente su introducción continua en el medio ambiente, no necesiten ser persistentes para ocasionar efectos negativos (Petrovic *et al.*, 2003).

En general, los fármacos son obtenidos por síntesis orgánica y su paso a través de los sistemas biológicos no garantiza su total biotransformación; aunque algunos de éstos son metabolizados en el hígado, en su mayor parte son eliminados en forma intacta o como productos de su biodegradación, los cuales son vertidos en los drenajes que llegan a plantas de tratamiento de aguas residuales o a otros cuerpos receptores provocando alteraciones ambientales o su bioacumulación en algunos de los niveles de la cadena trófica (Nicolaou *et al.*, 2007; Santos *et al.*, 2007).

De todos los CE, los que probablemente producen mayor preocupación son los fármacos, los cuales se encuentran con bastante frecuencia en el medio ambiente (Behera *et al.*, 2011; Zhou *et al.*, 2013). En la Figura 1 se muestran las diferentes rutas de eliminación de los fármacos hacia diferentes cuerpos receptores de agua (modificado de Heberer, 2002).



**Figura 1. Contaminación de aguas residuales por productos farmacéuticos.** Modificado de Heberer (2002).

La principal vía de entrada de los fármacos en el ciclo del agua es a través de las plantas de tratamiento de aguas residuales. Muchos de estos compuestos debido a sus características químicas no van a ser eliminados en los procesos convencionales de depuración, de manera que, dependiendo del tipo de compuesto, se encontrarán en el efluente tratado de la planta o en los biosólidos que se generan en el proceso de depuración, por lo que continuarán en el ciclo del agua. En el caso de que estos compuestos hayan sido retenidos en los biosólidos terminarán apareciendo en el ciclo del agua por procesos de escorrentía y lixiviación. Por lo tanto pese a que la cantidad que ingresa de los productos farmacéuticos y sus respectivos metabolitos al medio ambiente es baja, su continuo ingreso ha generado acumulaciones y esto ha provocado efectos adversos tanto en organismos acuáticos como terrestres (Carmona, 2012). El problema radica en que la mayoría de los fármacos están diseñados para que sean estables y mantengan su actividad terapéutica (Roberts y Thomas, 2006). Además, se consideran compuestos orgánicos refractarios porque poseen una

degradación biológica muy lenta o tienden a resistir tratamientos convencionales, sin lograr la descomposición de éstos (Gerbaldo *et al.*, 2019).

A partir de los años noventa se comenzaron a cuantificar los fármacos en aguas residuales, detectándose concentraciones entre partes por billón (ppb) y partes por trillón (ppt) (Heberer, 2002; Verlicchi *et al.*, 2012). En España, se han encontrado concentraciones de  $0.005 \mu\text{g L}^{-1}$  a  $2.144 \mu\text{g L}^{-1}$  en efluentes de plantas de tratamiento y trazas en agua potable (Rodríguez, 2010). En México se han reportado presencia de fármacos en las aguas residuales procedentes de hospitales, de centros de producción de medicamentos o municipales, en los efluentes de plantas de tratamiento de aguas residuales y en las aguas superficiales, alcanzándose concentraciones de  $0.225 \mu\text{g L}^{-1}$  tanto para el DCF como para el ibuprofeno (Ramos, 2009).

En la Tabla 1 se describen los rangos de concentración de diferentes grupos terapéuticos que son considerados tóxicos en el ambiente acuático (Valdés, 2009).

**Tabla 1. Presencia de productos farmacéuticos en organismos acuáticos.**

| Sustancia         | Extremadamente tóxico<br>$\text{CE}_{50} < 0.1 \text{ mg L}^{-1}$ | Muy tóxico<br>$\text{CE}_{50} 0.1-1 \text{ mg L}^{-1}$ | Tóxico<br>$\text{CE}_{50} 1-10 \text{ mg L}^{-1}$ | Dañino<br>$\text{CE}_{50} 10-100 \text{ mg L}^{-1}$ | No Tóxico<br>$\text{CE}_{50} > 100 \text{ mg L}^{-1}$ |
|-------------------|---|--|---|---|---|
| Analgésicos       |   |  | D   | D, E  |   |
| Antibióticos      | A   | B  |   |   |   |
| Antidepresivos    |   | D  |   |   |   |
| Antiepilépticos   |   |  | C   |   | D, E  |
| Cardio-vasculares |   | D  |   |   |   |
| Citostáticos      |   | A  |   | D, E  |   |

Donde: A (Microorganismo); B (Alga); C (Celentéreos); D (Crustáceos); E (Peces).

Los analgésicos y antiinflamatorios no esteroideos (AINEs) como el ibuprofeno, diclofenaco, naproxeno, acetaminofén y el ácido acetilsalicílico (AAS) son productos ampliamente usados a nivel mundial y son considerados los de mayor consumo. Los AINEs actúan inhibiendo la enzima ciclooxigenasa (COX), responsable de la síntesis

de prostaglandinas a partir del ácido araquidónico. Además, bloquea la acción del glutamato, neuromodulador responsable del proceso de amplificación de la respuesta de sensibilización periférica al dolor, e inhibe a la elastasa de los gránulos de los leucocitos polimorfonucleares y a proteínas que participan en la degradación del cartílago en los procesos reumáticos crónicos (Roberts y Morrow, 2007).

El organismo no es capaz de metabolizar totalmente el antiinflamatorio ingerido, por lo que se excreta junto con los metabolitos resultantes. Las aguas que lo contienen llegan en última instancia a las plantas de tratamiento donde una pequeña fracción puede quedar retenida en los biosólidos afectando al medio ambiente debido al fenómeno de bioacumulación y a la toxicidad del fármaco (Morales, 2012). Estos compuestos no se encuentran regulados por las normas de calidad existentes por lo que constituyen un riesgo al medio ambiente (Acosta, 2010).

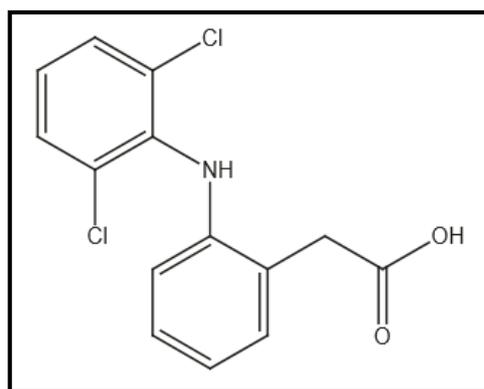
Tanto en países en desarrollo como industrializados se han detectado antiinflamatorios no esteroideos comercializados internacionalmente, donde el diclofenaco se detecta en el medio acuático de 50 países en el mundo, siendo el fármaco mayormente encontrado (IWW, 2014).

En el 2012, Fierce Pharma reportó que el diclofenaco se encontraba en el lugar 12 de las moléculas genéricas mayormente vendidas a nivel mundial. En el 2015, la Intercontinental Medical Statistics (IMS Health, empresa estadounidense que brinda información, servicios y tecnología para la industria de la salud) estimó que aproximadamente  $1443 \pm 58$  ton de diclofenaco son consumidas anualmente, esto fue evaluado solo en el 82% de la población mundial, sin considerar el uso veterinario ni la venta libre (Sathishkumara *et al.*, 2020).

### **1.1.1. Diclofenaco (DCF)**

El diclofenaco es comúnmente reconocido como el analgésico más popular del mundo y también como el AINEs mayormente usado (McGettigan y Henry, 2013). El nombre “diclofenaco” proviene de su nombre químico: ácido 2-(2,6-dicloroanilino) fenilacético, es derivado del ácido acético y comúnmente usado para la inflamación y aliviar el dolor en enfermedades como artritis. Fue descubierto por Ciba-Geigy, una compañía suiza

farmacéutica en 1973 (ahora fusionada con Novartis) (Lonappan *et al.*, 2016). La estructura química se muestra en la Figura 2, mientras que sus propiedades fisicoquímicas se muestran en la Tabla 2 (SRC PhysProp Database, 2012).



**Figura 2. Estructura química del diclofenaco**

**Tabla 2. Propiedades del diclofenaco.**

| Propiedad  | Valor  |
|--|--|
| Peso molecular   | 296.16 g mol <sup>-1</sup>   |
| Solubilidad en agua  | 2.37 mg L <sup>-1</sup> (25 °C)                                    |
| Constante de la Ley de Henry   | 4.79 x 10 <sup>-7</sup> Pa m <sup>3</sup> mol <sup>-1</sup> (25°C) |
| Puntos de fusión y ebullición  | 283-285 °C y 412 °C a 760 mm Hg                                    |
| Constante de ionización (pK <sub>a</sub> )                                 | 4.15   |
| Logaritmo del coeficiente de partición octanol-agua (Log K <sub>ow</sub> ) | 4.57   |

El DCF se metaboliza en el hígado por acción del citocromo P<sub>450</sub>, el cual corresponde a un miembro del sistema oxidasa que participa en el metabolismo de xenobióticos en el cuerpo; biotransformando el DCF a 4-hidroxiclofenaco que es el metabolito principal y otras formas hidroxiladas, sufriendo posteriormente glucuronidación y sulfatación. De 10 a 50% sufre una biotransformación por medio de las enzimas generando el 5-hidroxiclofenaco (Martínez *et al.*, 2006). Más del 90%

del diclofenaco es excretado en 72 h, un 65% por vía urinaria y un 35% por heces fecales y mediante las descargas de las aguas residuales municipales llega a las plantas de tratamiento de aguas residuales (González *et al.*, 2006; Valdez, 2009).

Se han reportado concentraciones de DCF en agua residual (0.35-4.11  $\mu\text{g L}^{-1}$ ), en efluentes de plantas de tratamiento (0.2- 136  $\mu\text{g L}^{-1}$ ), en agua superficial (0.225  $\mu\text{g L}^{-1}$ ) y en agua potable (0.114  $\mu\text{g L}^{-1}$ ) (Rodríguez, 2010; Vieno y Sillanpää, 2014; Robledo *et al.*, 2017; Phytocontrol, 2020).

Entre los efectos adversos del DCF se ha reportado que la exposición de peces a este fármaco altera el funcionamiento de los riñones, produce necrosis en las células de las branquias y se acumula en el hígado, los riñones, las branquias y el tejido muscular; además, estimula la teratogenicidad y la muerte de embriones (Dietrich y Prietz, 1999; Schwaiger *et al.*, 2004). Asimismo, el DCF se ha correlacionado con fallas renales en buitres orientales de lomo blanco a través de la exposición a residuos de este fármaco (Oaks *et al.*, 2004). También se determinó que la exposición crónica de medaka japonesa (*Oryzias latipes*) al DFC (0.001-10  $\text{mg L}^{-1}$ ) durante tres meses produjo una reducción significativa y retrasó la eclosión de los huevos; proceso que se inhibe completamente a una concentración de diclofenaco de 10  $\text{mg L}^{-1}$  (Lee *et al.*, 2011). Gröner *et al.* (2017) informaron que el DFC, en concentraciones ambientalmente relevantes o elevadas, afecta la histopatología de las branquias de *Oreochromis niloticus* y la expresión génica de la glándula pituitaria y tiene el potencial de actuar como un compuesto disruptor endocrino estrogénico.

## **1.2. TRATAMIENTOS PARA LA ELIMINACIÓN DE CONTAMINANTES EMERGENTES**

Las plantas de tratamiento de aguas residuales existentes han sido diseñadas para la eliminación de contaminantes y cargas de contaminación eutrofizantes, especialmente aquellas que se especifican en las reglamentaciones existentes. Sin embargo, la aparición de microcontaminantes "no regulados", como los fármacos, requiere de un tratamiento avanzado. Además, debemos tener en cuenta que estos contaminantes poseen una amplia gama de propiedades químicas y, por lo tanto, el éxito en la

eliminación variará con base en sus propiedades particulares, inclusive se ha detectado que muchos compuestos persisten sin alteración aún después de aplicar tratamientos terciarios. La remoción de DCF en algunas plantas de tratamiento de aguas residuales se ha reportado menor a un 20% (Yu *et al.*, 2006; Zorita *et al.*, 2009; Fatta-Kassinos *et al.*, 2011).

Entre los tratamientos usados para la remoción de fármacos se encuentran los fisicoquímicos que incluyen procesos tradicionales de tratamientos de aguas tales como la coagulación, floculación y ultrafiltración mediante el uso de membranas, además de la oxidación y el empleo de adsorbentes. Sin embargo, estos tratamientos requieren la adición constante de compuestos que pudieran formar subproductos tóxicos, surgiendo la necesidad de confinarlos. La mayoría de estos procesos requieren una alta cantidad de energía y son incapaces de remover fármacos esteroideos y productos de cuidado personal por sí solos (Bolong *et al.*, 2009).

Los tratamientos de oxidación avanzada también han sido estudiados para la remoción de fármacos, en los cuales se utiliza fotocatalisis nanoestructurada; tienen ventajas tales como la estabilidad química de la mayoría de los fotocatalizadores utilizados. Sin embargo, su aplicación al tratamiento de grandes volúmenes de agua es difícil debido al costo de la radiación artificial a través de lámparas UV eléctricas (Prieto-Rodríguez *et al.*, 2012; Quiroga *et al.*, 2015). La tecnología de filtración por membranas tales como la ósmosis inversa y la nanofiltración ha mostrado ser una alternativa prometedora para eliminar contaminantes. La nanofiltración es menos efectiva que la ósmosis inversa; sin embargo, con esta última se puede tener una remoción casi completa de contaminantes, pero su alto consumo energético la hace desfavorable (Wu, 2012).

Por otra parte, los tratamientos biológicos implican el uso de lodos activados y filtros de goteo biológico que pueden convertir rápidamente compuestos orgánicos acuosos en biomasa, la cual se puede separar de la fase acuosa por sedimentación. Aun así, no todos los compuestos como esteroides o estrógenos son convertidos a biomasa. En general, los tratamientos biológicos efectúan solo la eliminación parcial de una amplia gama de contaminantes emergentes, especialmente polares, que se

descargan en el efluente final. Por lo tanto, es necesaria la aplicación de mejoras a estos tratamientos para cumplir con los requisitos y reciclar aguas residuales municipales e industriales, incluso agua potable (Bolong *et al.*, 2009).

Además de las tecnologías mencionadas existe la biorremediación, la cual se basa en el uso de diferentes organismos como microalgas, plantas, hongos y bacterias, entre otros, para neutralizar o remover sustancias tóxicas. Este tipo de tratamiento puede ser muy efectivo en la eliminación de compuestos orgánicos tóxicos y biodegradables en suelos y aguas residuales; sin embargo, algunos procesos de tratamiento como el uso de plantas en humedales artificiales requieren una amplia extensión de terreno, tienen costos de construcción medio-altos y acumulan sustancias tóxicas en el suelo (Cruz-Guzmán, 2007). Las microalgas han demostrado ser capaces de remover contaminantes altamente tóxicos como metales y algunos compuestos orgánicos como los fármacos.

En la Tabla 3 se indican diferentes procesos de tratamientos para la remoción de diferentes fármacos y su eficiencia.

**Tabla 3. Remoción de antiinflamatorios no esteroideos por diferentes tratamientos.**

| Tratamiento     | Método                                  | Fármaco                               | Remoción          | Bibliografía                        |
|-----------------|---|---------------------------------------|-------------------|-------------------------------------|
| Físico-químicos | Cloración                               | -----                                 | No aceptable      | Nájera <i>et al.</i> , 2014         |
|                 | Coagulación                             | Aspirina                              | <20%              | Nájera <i>et al.</i> , 2014         |
|                 | Ozono                                   | Ibuprofeno<br>Diclofenaco             | 90%<br>90%        | Westerhoff <i>et al.</i> , 2005     |
| Avanzados       | Extracción por solvente con ultrasonido | Ibuprofeno<br>Diclofenaco             | 93%<br>88%        | Morales, 2012                       |
|                 | Ultrafiltración                         | Diclofenaco<br>Ibuprofeno             | 50% - 80%<br>85%  | Rauch-Williams <i>et al.</i> , 2010 |
|                 | Oxidación avanzada                      | Ibuprofeno<br>Diclofenaco             | 90%<br>90%        | Zwiener y Frimmel, 2000             |
|                 | Reactores de lecho móvil                | Diclofenaco<br>Ibuprofeno<br>Aspirina | 76%<br>94%<br>91% | Luo <i>et al.</i> , 2014            |

|           |                       |                                       |                                   |   |
|-----------|-----------------------|---------------------------------------|-----------------------------------|---|
| Biológico | Lodos<br>activados    | Ibuprofeno<br>Aspirina                | 12-86%<br>90%                     | Heberer, 2002   |
|           | Humedales             | Ibuprofeno<br>Diclofenaco<br>Aspirina | 80% - 91%<br>17%- 52%<br>35% -89% | Zhang <i>et al.</i> , 2011<br>Roig, 2013  |
|           | Filtros<br>biológicos | Aspirina<br>Diclofenaco               | <80%<br>69%                       | Tixier <i>et al.</i> , 2003   |
|           | Microalgas            | Diclofenaco                           | 40% - 99%                         | De Wilt <i>et al.</i> , 2016<br>Escapa <i>et al.</i> 2017<br>Ben-Ouada <i>et al.</i> 2019 |

### 1.3. FICORREMEDIACIÓN

La ficorremediación es el empleo de algas (macroalgas o microalgas) para la eliminación o transformación de contaminantes, incluyendo nutrientes presentes en el agua o el CO<sub>2</sub> y está asociada con la producción de biomasa (Rawat *et al.*, 2011). La ficorremediación se considera un proceso global ya que hay remoción de sales, aumento del pH de los efluentes, eliminación de nitrógeno amoniacal, disminución de la demanda biológica de oxígeno, oxigenación del agua, oxidación continua de materia orgánica y recuperación de CO<sub>2</sub> (Kojima y Lee, 2001; Bermeo, 2011; Kumar *et al.*, 2015).

Las microalgas también se emplean para la eliminación de sustancias tóxicas, como pesticidas, herbicidas y metales pesados, entre otros; debido a su capacidad de acumular elevadas concentraciones de compuestos tóxicos, sin afectar su actividad biológica.

Otro beneficio de las microalgas es su tendencia a liberar O<sub>2</sub> por medio de la fotosíntesis, ayudan a regular el contenido de oxígeno y dióxido de carbono en la atmosfera, contribuyendo a aliviar el efecto invernadero y proporcionar el material orgánico presente en los ecosistemas acuáticos. También degradan compuestos orgánicos generando biomasa, la cual puede ser reutilizada en sistemas de producción

de biocombustibles y/o en procesos de avicultura, acuicultura o agricultura (Arrieta, 2008; Mehrabadi *et al.*, 2015).

Entre los contaminantes que pueden ser removidos por microalgas se encuentran los fármacos; sin embargo, la información descrita en la literatura es escasa (De Wilt *et al.*, 2016; Escapa *et al.* 2017; Ben-Ouada *et al.* 2019).

#### **1.4. MICROALGAS**

Las microalgas son algas de tamaño microscópico cuyo tamaño puede oscilar aproximadamente entre 1 y 400  $\mu\text{m}$ . Son un conjunto heterogéneo de microorganismos fotosintéticos unicelulares, en esta categoría quedan agrupadas las cianobacterias, conocidas como algas verdeazuladas, junto con algas eucariotas, las cuales incluyen algas verdes, rojas y doradas (Forján, 2014). Se localizan en diversos ambientes y requieren para su desarrollo de una fuente de carbono, luz, nutrientes en cantidad suficiente y un intervalo apropiado de temperatura (Meng *et al.*, 2009).

Las microalgas presentan una capacidad de producción de biomasa a partir de energía solar muy superior a las plantas, registrándose valores próximos a un 9% frente al 2% de las plantas (Lee, 2001).

La investigación sobre el uso de las microalgas para la remediación es un campo de oportunidad al ser organismos de elevada producción de biomasa, inocuos y fotoautótrofos (en general); es decir, obtienen la energía de la luz proveniente del sol y se desarrollan a partir de materia inorgánica. Sin embargo, algunas especies son capaces de crecer empleando materia orgánica como fuente de energía o de carbono (Ruiz, 2011; Ajayan *et al.*, 2015; Ballen-Segura *et al.*, 2016).

De acuerdo a Ruiz (2011), el desarrollo de microalgas puede ser: a) Fotoautótrofo, donde las algas obtienen la energía del sol y el carbono de compuestos inorgánicos; b) Fotoheterótrofo, obtienen la energía del sol y emplean compuestos orgánicos como fuente de carbono; c) Heterótrofo, los compuestos orgánicos proporcionan tanto la energía como la fuente de carbono; es decir, existen algas que pueden desarrollarse bajo ausencia de luz; d) Mixotrófico, muchas algas son capaces de crecer bajo procesos tanto autótrofos como heterótrofos de manera que la fuente

de energía es tanto la luz como la materia orgánica, el carbono lo obtienen por tanto de compuestos orgánicos y de CO<sub>2</sub>.

#### **1.4.1. Cultivo de microalgas**

##### **1.4.1.1. Nutrientes y su función**

Los nutrientes determinan la velocidad de crecimiento y la composición bioquímica de las células en cultivo.

El carbono (C) es el macronutriente más importante, constituye el 50% de la biomasa microalgal. Las microalgas pueden emplear como fuente de carbono el CO<sub>2</sub> presente en la atmósfera, así como los iones bicarbonato (HCO<sub>3</sub><sup>-</sup>) con la ayuda de la anhidrasa carbónica, enzima que le permite acumular hasta 20 veces más del C inorgánico que se encuentra en el medio. El aporte de CO<sub>2</sub> mediante aireación facilita la mezcla del cultivo, impide la sedimentación celular, favorece la exposición de las células a la luz y a los nutrientes y mejora el intercambio de gas entre el medio de cultivo y el aire (Olivares, 2010). El carbono forma parte de la estructura de los carbohidratos que pueden ser estructurales y de reserva. Los primeros se encuentran como componentes principales de las paredes celulares y los segundos se acumulan principalmente en los cloroplastos, en condiciones de limitación de nutrientes o de saturación de luz (León-Saiki, 2018).

El nitrógeno (N) es el nutriente más importante para las microalgas después del carbono. El contenido en nitrógeno de la biomasa puede suponer desde un 1% hasta más de 10%, porcentaje que depende de la biodisponibilidad y el tipo de fuente de nitrógeno. En general, las microalgas pueden tomar nitrógeno del medio en forma de urea, amonio, nitrato, nitrito, nitrógeno molecular y óxidos de nitrógeno (NO<sub>x</sub>) (Ruiz, 2011). En la literatura se describe una gran diferencia en el crecimiento y en composición química debido a las variaciones en la concentración de nitrógeno. Cuando el nitrógeno se agota o deja de suministrarse, el crecimiento cesa ya que no se almacena en el interior celular siendo un componente esencial de péptidos, proteínas, enzimas, clorofilas, moléculas de transferencia de energía, material genético y otros constituyentes celulares (Sánchez-Varo, 1995; Barsanti y Gualtieri,

2014). La deficiencia de N afecta no solo a los rendimientos microalgales, sino también cambia las vías anabólicas de la síntesis de proteínas hasta la acumulación de carbohidratos o lípidos (León-Saiki, 2018). También influye directamente en la formación de aminoácidos, lo cual a su vez limita la traducción del ARNm (ácido ribonucleico mensajero) y, por lo tanto, se reduce la síntesis de proteínas. Por otra parte, la eficiencia del fotosistema II disminuye inicialmente como una consecuencia de la disipación térmica de la energía de excitación absorbida por el aparato fotosintético, derivando en una disminución de la tasa de fotosíntesis, lo cual a su vez lleva a una reducción de la tasa de respiración (Wehr, 2007).

El fósforo (P) es un macronutriente fundamental en la formación de ácidos nucleicos y transferencia de energía. El P tiene un papel fundamental en la biosíntesis de las membranas celulares constituidas por fosfolípidos, por lo que su presencia es necesaria en la división celular (Butusov y Jernelöv, 2013). Existen factores que disminuyen la captación de fosfatos por parte de las algas como un pH excesivamente alto o bajo o la ausencia de iones como potasio, sodio o magnesio. La cantidad necesaria de fósforo es mucho menor que la de nitrógeno para una misma cantidad de biomasa generada (Ruiz, 2011), pero su limitación puede afectar importantemente el desarrollo de las microalgas.

Diversos autores concluyen que la captación de nutrientes por parte de las microalgas se ve influida por la relación N:P en el medio de cultivo, de modo que se producirá un mayor crecimiento y toma de nutrientes cuanto más próxima esté a la composición de las microalgas. Sin embargo, como las microalgas son capaces de adaptarse al medio de cultivo pueden tomar, en principio, uno de los nutrientes en una proporción mayor que la presente en su composición celular (Ruiz, 2011). Por otro lado, se ha reportado que un déficit de nutrientes provoca en las microalgas una acumulación de lípidos siempre que haya luz y CO<sub>2</sub> disponibles (Khozin-Goldberg y Cohen, 2006; Rodolfi y Zittelli, 2009).

En cuanto al oxígeno (O); éste debe ser controlado ya que altas concentraciones pueden inhibir la fijación de carbono por parte del enzima ribulosa-1,5-bisfosfato carboxilasa/oxigenasa (RuBisCo). Esta inhibición se ve favorecida por

alta radiación y temperatura, así como en el caso de déficit de CO<sub>2</sub>. Muchas especies de microalgas no son capaces de sobrevivir en un medio sobresaturado de oxígeno más de 2 o 3 h (para algunas el 120% de saturación en el aire, para otras el 200%). Además, la producción fotosintética de oxígeno en cultivos de alta densidad puede alcanzar hasta 40 mg L<sup>-1</sup>, de modo que mediante la radiación adecuada pueden llegar a desarrollarse radicales de oxígeno. Los radicales libres serían tóxicos para las células y causarían daños en sus membranas. La presión parcial del oxígeno en el cultivo puede disminuirse mediante aumento de la turbulencia y burbujeo de aire (Ruiz, 2011).

Además del C, N y P, otros elementos son necesarios para el cultivo de microalgas que incluyen tanto macronutrientes (S, K, Na, Fe, Mg, Ca) como micronutrientes o elementos traza (B, Cu, Mn, Mo, Zn, V y Se), tal como se observa en la composición elemental de las células microalgales. Muchos de los elementos traza son relevantes en reacciones enzimáticas y en la biosíntesis de compuestos necesarios para el metabolismo. Al igual que el P, estos elementos traza muestran cierta afinidad por otros compuestos del medio y precipitan. Para evitar este problema, están incluidos en los medios de cultivo agentes quelantes de metales como el EDTA (Cota, 2019).

#### **1.4.1.2. pH**

El pH de las microalgas tiene diversos requerimientos para su crecimiento, en condiciones alcalinas la disponibilidad de CO<sub>2</sub> puede ser limitante para el crecimiento y la fotosíntesis. Los rangos de pH de crecimiento para las microalgas se encuentran entre 7 y 9, con un óptimo entre 8.2 y 8.7. El control de pH se consigue mediante aireación o adición de CO<sub>2</sub>. Esto es debido a que el proceso fotosintético de fijación de CO<sub>2</sub> provoca un aumento gradual de pH en el medio por la acumulación de OH<sup>-</sup>. El aumento en el pH puede promover la eliminación de nitrógeno en forma de amoníaco por burbujeo a la atmósfera ya que la disociación de NH<sub>4</sub><sup>+</sup> a NH<sub>3</sub> se produce a partir de valores de pH superiores a 8. La forma de NH<sub>4</sub><sup>+</sup> prevalece hasta valores de pH inferiores a 9.25, valores superiores a 9.25 ocasionan que el NH<sub>3</sub> predomine sobre el NH<sub>4</sub><sup>+</sup>, aumentando la velocidad de remoción del N a través de la volatilización de NH<sub>3</sub>.

La eliminación del fósforo se ocasiona porque el ortofosfato en pH alto tiene tendencia a unirse a otros cationes ( $\text{Ca}^{2+}$  o  $\text{Fe}^{3+}$ ) y precipitar (Markou y Georgakakis, 2011; Ruiz, 2011; Benavente-Valdés *et al.*, 2012; Pérez, 2019).

#### **1.4.1.3. Temperatura**

El rango óptimo de temperatura en el crecimiento de microalgas se encuentra entre los 20 y 24°C, aunque pueden tolerar temperaturas entre 16 y 27°C, las temperaturas menores a 16°C afectan su crecimiento, temperaturas mayores a los 35°C causan la muerte para un gran número de especies de microalgas (Olivares, 2010; Benavente-Valdés *et al.*, 2012; García, 2014).

Cuando el dióxido de carbono o la luz son limitantes en el cultivo, la temperatura no ejerce una influencia significativa (Ruiz, 2011).

#### **1.4.1.4. Luz y agitación**

Los organismos fotosintéticos sólo emplean la fracción del espectro de luz solar que es fotosintéticamente activa, es decir entre 350 y 700 nm. Este rango del espectro fotosintético supone un 40% de la radiación total del Sol. La mayor parte de los ecosistemas naturales vegetales presentan una eficiencia de alrededor del 1% en lo que a conversión de energía lumínica a biomasa se refiere. Se ha demostrado para las microalgas eficiencias de conversión luz-biomasa entre 1 y 4 % en sistemas abiertos y aún mayores en fotobiorreactores cerrados (Stephens *et al.*, 2010). En las microalgas, la tasa específica de crecimiento aumenta a medida que la intensidad de luz crece hasta alcanzar la tasa máxima de crecimiento, momento en el cual el desarrollo decrece con el aumento de la intensidad de luz debido a la fotoinhibición. Así, la irradiancia promedio recibida en cada célula depende de la geometría del reactor, de la irradiancia incidente y del sistema de mezclado que debe garantizar una exposición óptima de todas las células existentes en el reactor mediante el continuo movimiento de las mismas desde zonas oscuras a iluminadas y viceversa, evitando la fotoinhibición (Benavente-Valdés *et al.*, 2012). La luz es generalmente el factor limitante en la producción de microalgas al aire libre (Pulz y Scheinbenbogan, 1998).

Además, la agitación facilita la eficiencia en el transporte de nutrientes, impide la sedimentación de las algas y su adherencia a las paredes del reactor y homogeniza el pH y asegura la distribución de los gases. Cabe resaltar que no todas las especies toleran una agitación fuerte que provea al reactor de un buen mezclado ya que son sensibles al estrés hidrodinámico (Ruiz, 2011).

#### **1.4.2. Mecanismos de remoción de sustancias atribuidos a las microalgas**

La degradación de contaminantes por microalgas involucra sistemas enzimáticos extracelulares e intracelulares.

La degradación extracelular de productos farmacéuticos implica la excreción de diversas sustancias poliméricas extracelulares, incluidos los polisacáridos, proteínas, enzimas sustituyentes (como polisacáridos unidos a grupos metil y acetilo) y lípidos a su entorno circundante. Pueden formar una matriz de biopelícula hidratada que actúa como un sistema de degradación extracelular al mantener las enzimas extracelulares con capacidad de degradar compuestos orgánicos sólidos o disueltos. Los polisacáridos y proteínas con carga positiva o negativa permiten la sorción de xenobióticos, contribuyendo a la restauración del ambiente. La biopelícula puede actuar como tensoactivo y emulsionante para aumentar la biodisponibilidad de los fármacos. Estas interacciones de diferentes sustancias poliméricas extracelulares y las células microalgales puede influir en la degradación intracelular a través de los subproductos formados (Flemming y Wingender, 2010; Xiao y Zheng, 2016).

La sorción de fármacos en microalgas es un mecanismo que depende de muchos factores, incluidas las propiedades del compuesto (características hidrofóbicas, estructura química, solubilidad en agua y propiedades ácido-base, entre otras) y las características del medio como pH, temperatura y fuerza iónica (Kûmmerer, 2008; Bui y Choi, 2010).

La adsorción de los compuestos químicos, como los fármacos, es un proceso extracelular que varía significativamente de acuerdo con la hidrofobicidad, estructura y grupos funcionales de los fármacos y de las microalgas. Los componentes principales de la biomasa de microalgas son proteínas (30-60%), carbohidratos (20-

30%), lípidos (10-30%) y cenizas (5-10%), estos porcentajes varían en función de la especie y condiciones de cultivo (Reboloso *et al.*, 2001). Las paredes celulares de las algas poseen notables similitudes estructurales debido a la presencia de polímeros como la celulosa, las pectinas, hemicelulosas, proteínas de arabinogalactano, extensina y lignina; la pared celular de las microalgas está cargada negativamente como resultado de los grupos funcionales dominantes, como son los grupos carboxilo y fosforilo. Los contaminantes con grupos catiónicos son atraídos activamente hacia la superficie extracelular de la microalga a través de la interacción electrostática, lo que resulta en una biosorción efectiva. Este proceso se ve afectado por múltiples comportamientos ambientales, incluyendo el movimiento, la biodisponibilidad y las características físicas y químicas del medio receptor como el agua, suelo y sedimento, entre otros.

La absorción de fármacos podría realizarse por difusión en las membranas celulares de las microalgas, lo cual depende en gran medida de las propiedades químicas de los compuestos, especialmente su hidrofobicidad (Stottmeister *et al.*, 2003). La hidrofobicidad generalmente se expresa como el coeficiente de reparto octanol y agua o  $\log K_{ow}$ . Un  $\log K_{ow}$  alto corresponde a una alta hidrofobicidad. Diversos estudios han indicado que los fármacos altamente hidrófobos ( $\log K_{ow} > 3$ ) se distribuyen preferentemente en entornos hidrófobos como las bicapas lipídicas de las células, mientras que los fármacos con solubilidad en agua moderada a alta ( $\log K_{ow} < 3$ ) son hidrófilos y se encuentran preferentemente en los entornos hidrófilos de sus componentes estructurales. Dichos compuestos son lo suficientemente lipófilos para moverse a través de la bicapa de lípidos de las membranas y aún ser suficientemente solubles en agua para viajar a los fluidos de las células (Dietz y Schnoor, 2001; Pilon-Smiths, 2005).

Después de la absorción, los contaminantes orgánicos pueden sufrir una degradación parcial o completa; pueden metabolizarse o transformarse en compuestos más polares y menos tóxicos (Salt *et al.*, 1998; Navarro-Aviñón *et al.*, 2007). En los procesos de degradación o transformación metabólica, las enzimas pueden actuar sobre compuestos orgánicos y mineralizarlos completamente en

compuestos inorgánicos tales como CO<sub>2</sub>, H<sub>2</sub>O y Cl<sub>2</sub> o parcialmente en intermedios estables que se almacenan en las vacuolas de las microalgas (McCutcheon y Schnoor, 2003).

En particular, la degradación intracelular de fármacos consiste en dos fases. Los ataques iniciales comienzan con la enzima de fase I (citocromo P450) que produce un compuesto más hidrofílico al generar o exponer un grupo funcional (por ejemplo, un hidroxilo) dentro de una molécula. Lo anterior puede ocurrir a través de la introducción directa del grupo funcional (por ejemplo hidroxilación aromática y alifática) o modificando los grupos funcionales existentes (por ejemplo reducción de cetonas y aldehídos a alcoholes, oxidación de alcoholes a ácidos, hidrólisis de ésteres y amidas y reducción de compuestos nitro) (Parkinson y Ogilvie, 2008). Entre las principales reacciones enzimáticas reportadas durante la degradación de fármacos por microalgas se incluyen la hidroxilación, carboxilación, oxidación, hidrogenación, glucosilación, desmetilación, escisión del anillo, descarboxilación, deshidroxilación y bromación (Thies *et al.*, 1996; Maes *et al.*, 2014; Peng *et al.*, 2014; Matamoros *et al.*, 2015; Xiong *et al.* 2016; Ding *et al.*, 2017; Xiong, *et al.*, 2017).

En la fase II están involucradas enzimas, como la glutatión-S-transferasa, que catalizan la reacción de conjugación entre compuestos electrofílicos y el glutatión. La conjugación enzimática de la fase II da como resultado la apertura del anillo epóxido para proteger contra el daño oxidativo. Varias enzimas intracelulares de microalgas como la mono y dioxigenasa, pirofosfatasa inorgánica soluble, glutamil-tRNA reductasa, malato/piruvato deshidrogenasa, uroporfirinógeno carboxilasa/descarboxilasa, deshidratasa, fosfatasa alcalina y ácida, transferasa, catalasa, lacasas, violaxantina de-epoxidasa, e hidrolasa participan en la biotransformación y desintoxicación de compuestos orgánicos endógenos (Wang *et al.*, 2004; Ferreira *et al.*, 2007; Mus *et al.*, 2007; Otto y Schlosser, 2014; Foflonker *et al.*, 2016).

### **1.4.3. Material biológico**

#### **1.4.3.1. *Chlorella vulgaris***

Es una microalga unicelular, eucariota, inmóvil, de forma esférica, con pared celular lisa y su diámetro oscila normalmente entre los 2 y 10  $\mu\text{m}$  (Figura 3). Su reproducción se da mediante la formación de autoesporas y forman grupos irregulares o colonias. Además, puede dividirse en cuatro células cada 20 h. Esta especie se encuentra en diferentes biotopos, incluso en simbiosis con ciliados, esponjas, hidras y otros organismos. La capa fibrosa que recubre la célula tiene la función de proteger las membranas celulares interiores para evitar que el alga se deshidrate, además de absorber y retener los nutrientes del medio (Moronta *et al.*, 2006; Aguirre *et al.*, 2007).

El género *Chlorella* incluye algas verdes con una alta concentración de *clorofila a* y *b*, así que su capacidad de fotosíntesis es mayor que la de otras plantas y algas permitiéndole carecer de un aporte exógeno de materia orgánica. Su situación en las cadenas tróficas como productor primario le convierte en un organismo ideal para experimentar su capacidad de acumular metales. Se desarrolla en medios marinos, en el agua dulce e incluso en suelos encharcados (Cai, Park y Li, 2013).

Se ha demostrado que es capaz de adsorber grandes cantidades de metales mediante un mecanismo de intercambio de iones. A continuación, el metal puede unirse a distintos grupos funcionales como aminas, alcoholes, fosfatos e hidroxilos. Uno de los factores que contribuyen a la eficacia de este sistema es la composición de la pared celular, la cual posee una mezcla compleja de azúcares, glucosamina, proteínas y ácido urónico. La segunda fase, llamada bioacumulación requiere de más reacciones de transporte a la vacuola (Cai *et al.*, 2013).

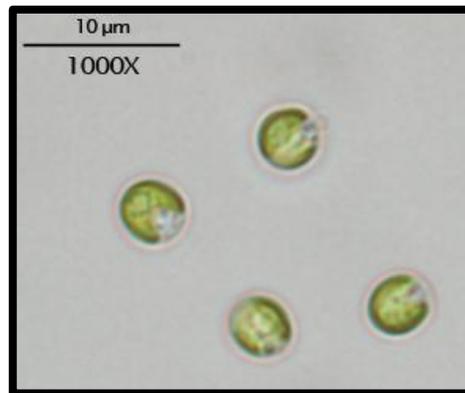


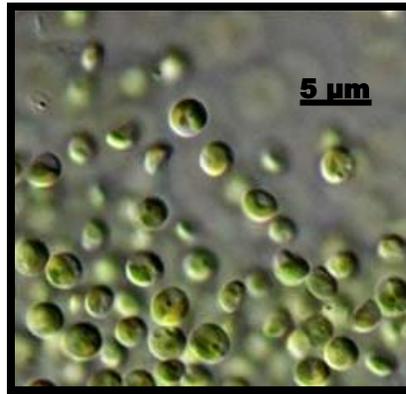
Figura 3. *Chlorella vulgaris* (UTEX, 2021).

#### 1.4.3.2. *Nannochloropsis oculata*

Son microalgas unicelulares de flotación libre, subesféricas, de 2 a 4 micras de diámetro, inmóviles, desprovistas de flagelos y poseen un cromatóforo sencillo parietal de color verde pálido que ocupa gran parte de la célula (Figura 4), el citoplasma posee una gran acumulación de lípidos. La reproducción se realiza exclusivamente mediante fisión binaria de las células. Su pared celular es lisa, está compuesta por capas microfibrilares de celulosa, xilano y mucílagos de polisacáridos amorfos, las células no acumulan almidón (Amaya y Sarmiento, 2010) y no tiene zoósporas ni formas de resistencia (Catalá, 2013). Las paredes celulares de *Nannochloropsis* también contienen algógenos (biopolímeros), los cuales son altamente resistentes a la hidrólisis alcalina-ácida, así como a la solubilización acuosa-orgánica (Jeffrey, 2007). También comprende hidrocarburos alifáticos de cadena larga que están sujetos a reacciones de reticulación, las cuales consisten en formar una red con éter (Gelin *et al.*, 1997), una descripción que se aplica al cutan (polímero producido en la cutícula) de varias especies de plantas resistentes a la sequía (Boom *et al.*, 2005).

El cloroplasto ocupa la mayor parte de la célula y contiene una serie de laminillas paralelas formadas por tres tilacoides cada una. Es una fuente de pigmentos tales como *clorofila a*, *zaexantina*, *cataxantina* y *astaxantina*. Su envoltura está formada por cuatro membranas, de las cuales 2 exteriores corresponden al retículo endoplásmico

(Lubián, 1982). *Nannochloropsis oculata* tiene la capacidad para convertir una porción significativa de su biomasa (hasta 60% en peso seco) en lípidos (Van Vooren *et al.*, 2012). Se desarrolla en medio marino, agua dulce y salobre (Fawley, 2007).



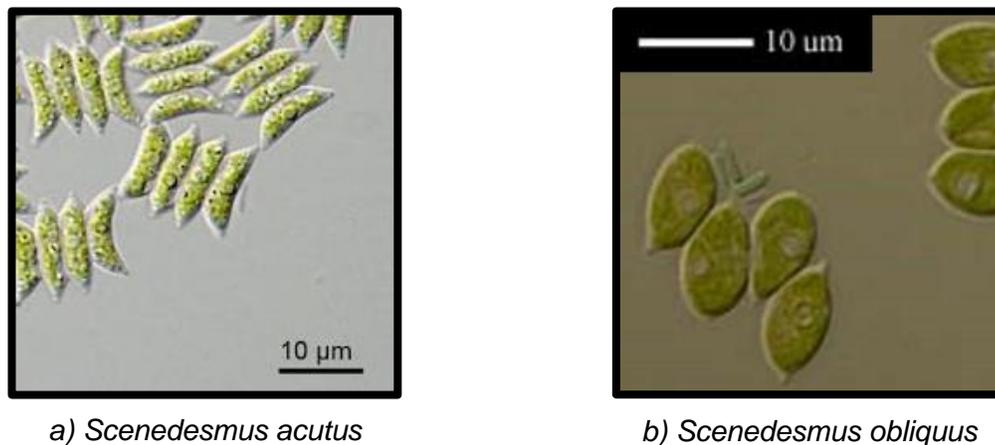
**Figura 4.** *Nannochloropsis oculata* (Baker, 2012).

#### **1.4.3.3. *Scenedesmus acutus y obliquus***

Todas las algas de este género son unicelulares pero se diferencian en tamaño y forma. El género *Scenedesmus* corresponde a microalgas pequeñas, no móviles y cenobiales. Sus dimensiones varían entre 8 y 25 μm de largo y 5-15 μm de ancho. Su reproducción es por autoesporas. Las células son elipsoides, ovoides o en forma de media luna, la pared celular es lisa. *Scenedesmus* tiene los orgánulos celulares típicos: núcleo rodeado de membrana, mitocondrias, pequeñas vacuolas, aparato de Golgi y una mancha ocular. Además, presenta un cloroplasto de gran tamaño en forma de copa con un pirenoide simple embebido en la parte basal. Este pirenoide está rodeado de gránulos de polisacárido que son el producto de reserva. Contiene *clorofila a* y *b* y su principal característica morfológica es la ausencia de una pared celular rígida de polisacárido. La célula está incluida en una delgada y elástica membrana plasmática y envuelta mucídica. Esto le permite responder rápidamente a cambios osmóticos, alterando su forma y volumen celular. Por otro lado, la falta de pared celular rígida aumenta su sensibilidad a fuerzas de tensión externa e impone algunas limitaciones a la manipulación de los cultivos (Olivares, 2010).

Esta especie tolera un amplio rango de temperatura, es viable a  $-3^{\circ}\text{C}$  y su movilidad cesa a  $-18^{\circ}\text{C}$ , permaneciendo fotosintéticamente activa por debajo de  $-8^{\circ}\text{C}$  y pH entre 5.5 - 8, siendo 6.8 el pH óptimo para su crecimiento, haciéndola versátil para el tratamiento de agua residual. Crece en aguas residuales urbanas, registrando tasas de crecimiento similares a las reportadas cuando se cultiva en un medio sintético. (Martínez *et al.*, 2000).

En la Figura 5 se muestra el aspecto morfológico de *S. acutus* (Figura 5a) y *S. obliquus* (Figura 5b).



**Figura 5. Especies del género *Scenedesmus*.** (Institute of Hydrobiology, 2013; Karlson *et al.*, 2020)

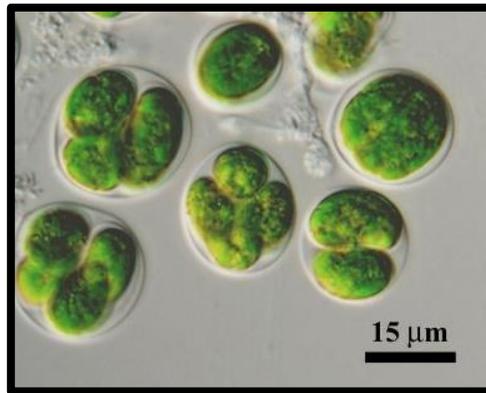
#### 1.4.3.4. *Chlamydomonas reinhardtii*

El género *Chlamydomonas* es muy amplio, es una microalga verde eucariote (clorofita), se le conoce como “la levadura verde” debido a su rápida multiplicación y fácil manipulación en cultivos de laboratorio. Las células tienen forma ovoide, elipsoidal o esférica (Figura 6), con un tamaño que oscila entre 9 y 12 μm de longitud y entre 4 y 8 μm de diámetro y es capaz de desarrollarse mixotróficamente; es decir, de forma autótrofa (puede producir sus propios nutrientes) o heterótrofa (donde los nutrientes se encuentran en los alimentos; de formas simples a una mezcla compleja) según la

disponibilidad de compuestos orgánicos y la intensidad lumínica y su reproducción puede ser sexual y asexual (Griesbeck *et al.*, 2006).

Están rodeadas por una pared bastante inusual ya que consta únicamente de glicoproteínas fibrosas ricas en hidroxiprolina y no contiene celulosa, a diferencia de la mayoría de las algas. En esta pared celular se pueden distinguir tres capas con diferente grosor en las diferentes especies: una capa central granular entre dos matrices cristalinas altamente ordenadas de subunidades glicoproteicas. En el polo anterior de la célula existe un engrosamiento de la pared celular que recibe el nombre de papila apical, la cual es atravesada por dos canales a través de los que se proyectan dos flagelos que son similares en estructura y longitud. En la mayoría de las especies el cloroplasto tiene forma de copa y es parietal. En la zona basal del cloroplasto se encuentran uno o más pirenoides, centro de producción de almidón. Además, el cloroplasto suele rodear parcialmente al núcleo, el cual generalmente está situado en el centro de la célula con un nucléolo prominente. El aparato de Golgi se sitúa con frecuencia alrededor del núcleo, a su vez suele estar rodeado por un sáculo de retículo endoplasmático que conecta con la membrana nuclear. En la mayoría de las especies, las mitocondrias se encuentran entre el cloroplasto y la plasmalema, así como en la región central de la célula. Es frecuente encontrar dos vacuolas contráctiles en el polo anterior de la célula, justo bajo los dos cuerpos basales de los flagelos (Cid, 2015). La mayor parte de su espacio intracelular (40%) está ocupado por un único cloroplasto con forma de copa, el cual posee aproximadamente 80 copias de su genoma (Griesbeck *et al.*, 2006).

*Chlamydomonas reinhardtii* contiene *clorofila a, c* y carotenoides. Se localiza en agua dulce, suelo húmedo, mar y nieve (Rivera-Solís *et al.*, 2011).



**Figura 6.** *Chlamydomonas reinhardtii* (Scaife *et al.*, 2015).

En este proyecto se utilizarán dos cepas de *Chlamydomonas reinhardtii* CC137 y CC1731, la diferencia entre ambas cepas es que la primera cuenta con pared celular mientras que la segunda carece de ésta.

### **1.5. ANTECEDENTES**

En 2009, CORE BIOTECH (Colombia) y Phycospectrum (India) instalaron un sistema integrado de tanques de 20 m<sup>3</sup> en la planta de “Pacific Rubiales” (cerca de Bogotá), la cual involucra el uso de algas en el proceso de remoción de contaminantes tales como xenobióticos que son usados como fuente nutricional y CO<sub>2</sub> (Phycospectrum, 2009).

En 2015, Matamoros *et al.*, evaluaron la eficiencia de eliminación de 26 microcontaminantes orgánicos de aguas residuales urbanas (CO<sub>2</sub>, NH<sub>4</sub><sup>+</sup>) con un consorcio microalgal. Los compuestos específicos incluyeron productos para el cuidado personal, retardantes de incendios, tensoactivos, agentes anticorrosivos, pesticidas, plastificantes y productos farmacéuticos (diclofenaco). La eficiencia de remoción de diclofenaco varió de 40 a 60%.

De Wilt *et al.* (2016) estudiaron la eliminación de microcontaminantes en un sistema de tratamiento de algas alimentado con corrientes de aguas residuales. Realizaron experimentos en lotes con la microalga *Chlorella sorokiniana* cultivada en orina, agua negra anaerobiamente tratada y orina sintética [Urea (CO(NH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>), K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>·2H<sub>2</sub>O] para evaluar la eliminación de seis fármacos (diclofenaco, ibuprofeno,

paracetamol, metoprolol, carbamazepina y trimetoprim). La biodegradación y la fotólisis fueron evaluados de manera independiente y condujeron a una eliminación de 60-100% de diclofenaco, ibuprofeno, paracetamol y metoprolol. En el caso del diclofenaco, se atribuye como principal proceso la fotodegradación, ya que tanto en los cultivos inoculados con microalgas como en los cultivos abióticos se obtuvieron porcentajes similares de remoción. La extracción de carbamazepina y trimetoprima fue incompleta y no superó el 30 y 60%, respectivamente. La absorción a la biomasa de algas representó menos de 20% de la remoción de microcontaminantes.

El 2017, Escapa *et al.*, determinaron la eliminación de ácido salicílico, paracetamol y diclofenaco por medio de 3 cepas de microalgas diferentes: *Chlorella sorokiniana*, *Chlorella vulgaris* y *Scenedesmus obliquus* en medio Mann & Myers (CO<sub>2</sub>, NaNO<sub>3</sub>, K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>). Se descubrió que la eficiencia de eliminación estaba relacionada con su crecimiento. Comparando los tres productos farmacéuticos, el ácido salicílico fue el más eficientemente eliminado, especialmente por *S. obliquus* (más de 93% en cultivo discontinuo y más de 99% en cultivo semicontinuo). Por el contrario, el paracetamol fue el que se eliminó más pobremente, siendo las eficiencias máximas alcanzadas por *C. sorokiniana* (más de 67% en cultivo discontinuo y más de 41% en cultivo semicontinuo). Por otro lado, el diclofenaco se eliminó eficientemente solo por *S. obliquus* (más de 98% en cultivo discontinuo y más 79% en cultivo semicontinuo).

Recientemente, Ben-Ouada *et al.* (2019), evaluaron la eliminación de diclofenaco (DCF) por medio de 2 cepas de microalgas aisladas: *Picocystis sp.* y *Graesiella sp.* en medio Basal Bold y Zourruk (NaHCO<sub>3</sub>, K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, NaNO<sub>3</sub>). Los resultados mostraron que el DCF tuvo ligeros efectos inhibitorios en el crecimiento de microalgas que no excedieron el 21% para *Picocystis* y el 36% para *Graesiella* después de 5 días. En presencia de *Picocystis sp.*, el diclofenaco se removió en 73, 43 y 25% de concentraciones iniciales de 25, 50 y 100 mg L<sup>-1</sup> respectivamente; mientras que solo el 52, 28 y 24% se eliminaron en presencia de *Graesiella* a las mismas concentraciones iniciales de DCF. Los resultados mostraron dos productos de biodegradación / biotransformación de DCF en presencia de *Picocystis*, correspondiendo a un compuesto hidroxilado y un producto monoaromático.

## CAPITULO II

### 2.1. JUSTIFICACIÓN

La liberación de fármacos de distinto origen y estructura química y cuya presencia en el ambiente pasa desapercibida en términos de distribución y concentración representa un serio problema ambiental tanto para el hombre, la flora y la fauna. En diferentes países se han encontrado altas concentraciones de diversos analgésicos y antiinflamatorios no esteroideos en aguas residuales tratadas, aguas superficiales, sedimentos e incluso en agua potable, ya que por su naturaleza no son completamente eliminados por los tratamientos convencionales.

Por estos motivos se buscan nuevas metodologías que permitan su remoción, a un bajo costo y sin la necesidad de contar con una gran infraestructura, por lo que se tiene como alternativa el uso de microalgas que se emplean en el proceso denominado como ficorremediación. Este proceso se considera viable ya que en diversos estudios se ha comprobado que es capaz de remover algunos fármacos, además de que las microalgas son de rápida multiplicación, fácil manipulación y algunas especies toleran un amplio rango de temperatura y pH. Sin embargo, la información es escasa, por lo que se requieren estudios más detallados sobre los mecanismos de remoción involucrados en el proceso de ficorremediación; además de que no se encuentran estudios reportados sobre la relación entre la deficiencia de nutrientes y la eliminación de fármacos.

Por lo anterior y debido a que el diclofenaco puede ser tomado por las microalgas como fuente de carbono, se desea evaluar el efecto del déficit de 3 de los principales macronutrientes (C, N y P) sobre la remoción de diclofenaco por 6 cepas de microalgas, ya que de esta forma se podrá elucidar qué especie, según sus características biológicas, posee la mayor capacidad para remover el fármaco mediante el mecanismo de adsorción para determinar su posible uso en ficorremediación.

## **2.2. HIPÓTESIS**

El crecimiento de *C. vulgaris* OW-01, *N. oculata* CCAP 849/7, *S. acutus* UTEX 72, *S. obliquus* CCAP 276/2 y *C. reinhardtii* CC137 y CC1731 en un medio con déficit de nutrientes (C, N y P) contribuye a la adsorción, absorción y biodegradación del diclofenaco al utilizarlo como fuente de carbono.

## **2.3. OBJETIVO GENERAL**

Evaluar la capacidad de 6 cepas de microalgas (*C. vulgaris* OW-01, *N. oculata* CCAP 849/7, *S. obliquus* CCAP 276/2, *S. acutus* UTEX 72 y *C. reinhardtii* CC137 y CC1731) para remover el diclofenaco en un medio con déficit de nutrientes (C, N y P) e identificar el porcentaje de fármaco removido por adsorción.

### **2.3.1. Objetivos específicos**

- Evaluar el efecto de diferentes concentraciones de diclofenaco sobre el crecimiento de cada microalga de manera independiente.
- Obtener las cinéticas de crecimiento de las microalgas bajo concentraciones iniciales diferentes de nitrógeno, fósforo y carbono en presencia y ausencia de diclofenaco
- Determinar la concentración de diclofenaco removido del medio de cultivo por cada una de las microalgas y definir el porcentaje de remoción por adsorción.
- Evaluar la contribución de la fotólisis en el proceso de degradación del diclofenaco en la solución.

## CAPITULO III

### 3. METODOLOGÍA

En este capítulo se describe la metodología para estimar la remoción y/o la degradación de diclofenaco por medio de 6 cepas de microalgas *C. vulgaris* OW-01, *N. oculata* CCAP 849/7, *S. obliquus* CCAP 276/2, *S. acutus* UTEX 72 y *C. reinhardtii* CC137 y CC1731. El procedimiento se resume en la Figura 7.

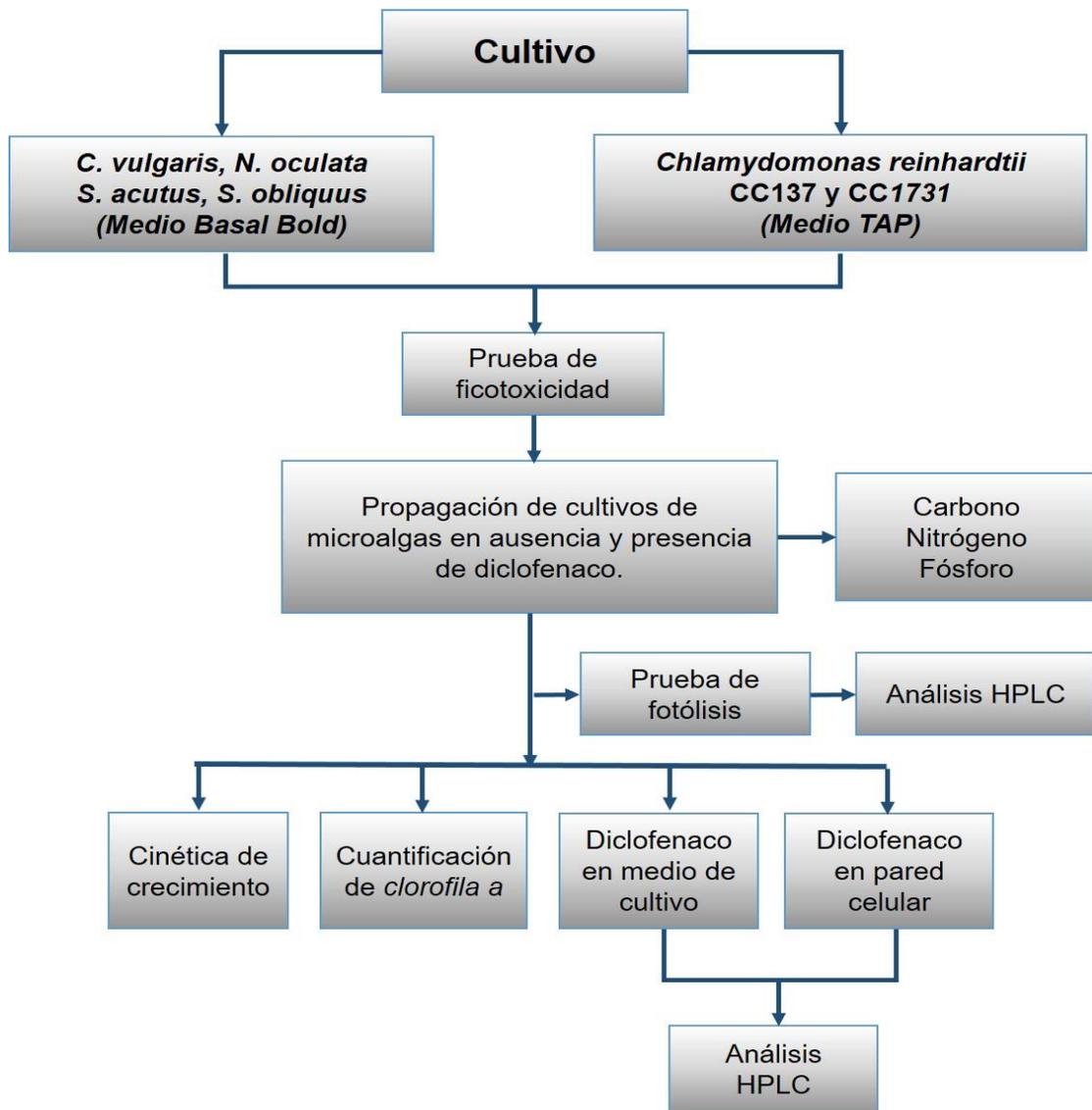


Figura 7. Diagrama de flujo de la metodología para la remoción de diclofenaco por 6 diferentes cepas de microalgas.

### 3.1. CULTIVO DE MICROALGAS

La Universidad Autónoma de Aguascalientes proporcionó las microalgas usadas en este proyecto. Los cultivos de *C. reinhardtii* CC137 y CC1731 se propagaron en medio Tris-Acetato-Fosfato (TAP) (López, 2014) ajustando el pH a 7 con ácido acético glacial concentrado e hidróxido de potasio. Se realizará la prueba con ambas cepas para analizar si la remoción del fármaco es favorecida por la adherencia a la pared celular o membrana celular. Mientras que las cepas de *C. vulgaris*, *N. oculata*, *S. acutus* y *S. obliquus* se propagaron en medio Basal Bold (Montes y Pulido, 2012).

Para llevar a cabo la propagación y mantenimiento de las cepas en medio sólido se agregaron 20 g de agar para la preparación de 1 L de medio TAP y medio Basal Bold. Los medios se esterilizaron por vapor a una presión de 103 kPa por 15 min y a una temperatura de 120°C. Se empleó la técnica de cultivo por estría en una caja Petri de vidrio con 20 mL de medio sólido, desarrollado bajo condiciones de esterilidad en campana Luzeren de flujo laminar tipo II BBS-DDC.

Las cepas resembradas se incubaron durante dos semanas en un cuarto de crecimiento a 25°C con una fuente de luz blanca con fotoperiodo de 16 h luz y 8 h oscuridad. Se modificó la composición de ambos medios para los siguientes experimentos, ya que en estudios previos realizados en el Laboratorio de Biotecnología Molecular de Células Vegetales se observó una interferencia del calcio (incluido en la composición original de ambos medios) en el análisis por cromatografía líquida de alta resolución para determinar la remoción de diclofenaco.

En las Tablas 4 y 5 se muestra la composición de los medios modificados utilizados para las diferentes cepas de microalgas (TAP y Bold).

**Tabla 4. Composición de la solución nutritiva TAP (Tris-Acetato-Fosfato).**

| TAP                                    | 1L      |
|--|---------|
| Tris base                              | 2.42 g  |
| Sales TAP                              | 25 mL   |
| -NH <sub>4</sub> Cl                    | 0.375 g |
| -MgSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O | 0.1 g   |

|                                    |                 |
|------------------------------------|-----------------|
| <b>Solución de fosfatos</b>        | <b>0.375 mL</b> |
| - $K_2HPO_4$ (anhidro)             | 0.108 g         |
| - $KH_2PO_4$                       | 0.054 g         |
| <b>Solución de metales</b>         | <b>1 mL</b>     |
| -EDTA (sin ácido)                  | 0.0636 g        |
| - $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$             | 0.022 g         |
| - $H_3BO_3$                        | 0.0114 g        |
| - $MnCl_2 \cdot 4H_2O$             | 0.00506 g       |
| - $CoCl_2 \cdot O$                 | 0.0016 g        |
| - $CuSO_4 \cdot 5H_2O$             | 0.0015 g        |
| - $(NH_4)_6Mo_7O_{24} \cdot 4H_2O$ | 0.0011 g        |
| - $FeSO_4 \cdot 7H_2O$             | 0.0049 g        |

**Tabla 5. Composición de la solución nutritiva Bold.**

| <b>Basal Bold</b>                         | <b>1 L</b>    |
|---|---------------|
| <b>Nitrato de sodio</b>                   | <b>25 g</b>   |
| <b>Sulfato de magnesio heptahidratado</b> | <b>7.5 g</b>  |
| <b>Cloruro de sodio</b>                   | <b>2.5 g</b>  |
| <b>Fosfato de potasio monohidratado</b>   | <b>7.5 g</b>  |
| <b>Fosfato de potasio dihidratado</b>     | <b>17.5 g</b> |
| <b>Solución de metales</b>                | <b>1 mL</b>   |
| - $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$                    | 0.0088 g      |
| - $MnCl_2 \cdot 4H_2O$                    | 0.0014 g      |
| - $MoO_3$                                 | 0.0007 g      |
| - $CuSO_4 \cdot 5H_2O$                    | 0.0015 g      |
| - $Co(NO_3)_2 \cdot 6H_2O$                | 0.0004 g      |
| - $H_3BO_3$                               | 0.0114 g      |
| -EDTA                                     | 0.05 g        |
| -KOH                                      | 0.031 g       |
| - $FeSO_4 \cdot 7H_2O$                    | 0.49 g        |
| - $H_2SO_4$                               | 0.01 mL       |

### 3.2. DISEÑO EXPERIMENTAL

Las concentraciones iniciales de carbono, nitrógeno y fósforo se definieron por un estudio completo de tres variables a dos niveles utilizando el programa STATISTICA. Las variables son los nutrientes (nitrógeno, fósforo y carbono) y los dos niveles correspondieron a las concentraciones de 50 y 100% sobre la composición del medio originalmente sugerida, teniendo volumen inicial de 70 mL. Las concentraciones iniciales de cada nutriente se muestran en la Tabla 6.

**Tabla 6. Concentración de los nutrientes (C, N, P) en los medios de cultivo sin modificar.**

| Nutriente | TAP (mg L <sup>-1</sup> ) | Basal Bold (mg L <sup>-1</sup> ) |
|-----------|---------------------------|----------------------------------|
| Carbono   | 84                        | 0.33                             |
| Nitrógeno | 375                       | 250                              |
| Fósforo   | 162                       | 250                              |

Las interacciones generadas por el programa corresponden a 8 combinaciones posibles (Tabla 7). A cada combinación se le asigna una letra propia para su distinción.

**Tabla 7. Diseño experimental de las diferentes concentraciones expresadas en porcentaje para cada nutriente.**

| Combinación | Nutriente |           |         |
|-------------|-----------|-----------|---------|
|             | Carbono   | Nitrógeno | Fósforo |
| A           | 50%       | 50%       | 50%     |
| B           | 100%      | 50%       | 50%     |
| C           | 50%       | 100%      | 50%     |
| D           | 100%      | 100%      | 50%     |
| E           | 50%       | 50%       | 100%    |
| F           | 100%      | 50%       | 100%    |
| G           | 50%       | 100%      | 100%    |
| H           | 100%      | 100%      | 100%    |

En la Tabla 8 se observa el diseño completo para cada una de las 6 cepas descritas. Para cada experimento se realizaron 3 réplicas biológicas.

**Tabla 8. Diseño experimental completo de las diferentes concentraciones de cada nutriente (C, N, P) por microalga para *C. vulgaris*, *N. oculata*, *S. acutus* y *S. obliquus*.**

|           | Experimento | Variables | Niveles |
|-----------|-------------|-----------|---------|
| Microalga | Sin fármaco | Carbono   | 50%     |
|           |             |           | 100%    |
|           |             | Nitrógeno | 50%     |
|           |             |           | 100%    |
|           |             | Fósforo   | 50%     |
|           |             |           | 100%    |
|           | Diclofenaco | Carbono   | 50%     |
|           |             |           | 100%    |
|           |             | Nitrógeno | 50%     |
|           |             |           | 100%    |
|           |             | Fósforo   | 50%     |
|           |             |           | 100%    |

Para las microalgas *C. reinhardtii* solo se realizaron los experimentos con las combinaciones A (50C 50N 50P) y H (100C 100N 100P).

El sistema de difusión de aire empleado para los cultivos de las cepas de *C. vulgaris*, *N. oculata*, *S. acutus* y *S. obliquus* se observa en la Figura 8.



**Figura 8. Sistema de cultivo de microalgas.** En matraces Erlenmeyer de 100 mL con diferentes concentraciones (50 y 100%) de nitrógeno, fósforo y carbono. Fotoperiodo 16 h luz y 8 h oscuridad a 25 °C.

### **3.3. PROPAGACIÓN DE LAS MICROALGAS A DIFERENTES CONCENTRACIONES DE NITRÓGENO, FÓSFORO Y CARBONO.**

Para la propagación de las microalgas en medio líquido, se tomó un inóculo del cultivo en medio sólido con un asa bacteriológica estéril y se transfirió a un tubo Falcon con 40 mL de medio TAP o Bold (según la cepa de microalga) también estéril, se mantuvieron por 2 semanas en agitación continua a 25°C y un fotoperiodo de 16 h luz y 8 h oscuridad, usando lámparas fluorescentes con una intensidad de 150  $\mu\text{mol}$  de fotones  $\text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$ .

El pre-inóculo anterior se transfirió a 200 mL de medio para continuar su crecimiento y obtener la biomasa utilizada en las diferentes condiciones (déficit de nitrógeno, fósforo y carbono), se mantuvo a las mismas condiciones de incubación hasta alcanzar una densidad óptica ( $\text{OD}_{750\text{nm}}$ ) de 0.25.

Las mediciones de la densidad óptica se realizaron a una longitud de onda de 750 nm en un espectrofotómetro GloMax®-MultiMicroplate Reader. Una vez alcanzada la densidad óptica del pre-inóculo ( $0.25_{750\text{nm}}$ ), los matraces con las diferentes concentraciones de nitrógeno, fósforo y carbono se inocularon con 7 mL de preinóculo, el cual corresponde al 10% del volumen inicial de medio (70 mL); el crecimiento de los cultivos continuó hasta alcanzar la fase estacionaria.

Para definir las posibles combinaciones para las concentraciones iniciales de nitrógeno, fósforo y carbono se realizó un estudio completo de tres variables a dos niveles, 50 y 100% de la concentración inicial de N, P y C utilizando el programa STATISTICA.

Para las microalgas *C. vulgaris*, *N. oculata*, *S. acutus* y *S. obliquus* la agitación y la aireación se mantuvieron constantes mediante un sistema de difusión de aire diseñado a base de mangueras de plástico conectadas a una bomba de aire de 2.2 L  $\text{min}^{-1}$ ; la uniformidad del flujo de aire en los experimentos se controló mediante válvulas reguladoras de flujo de ¼ de pulgada (in), se mantuvieron en un cuarto de incubación a 25°C y un fotoperiodo de 16 h luz y 8 h oscuridad.

En el caso de las cepas de *C. reinhardtii* CC137 y CC1731, para la homogenización de los cultivos se empleó una parrilla de agitación, considerando que al tener ácido acético como fuente carbono no requerían captar esta fuente por medio de aireación.

### **3.4. PREPARACIÓN DE SOLUCIONES STOCK DE DICLOFENACO**

Se utilizó el fármaco grado reactivo de la marca Sigma-Aldrich ( $\geq 98$  % de pureza). Es un fármaco fotosensible, su solubilidad en agua es de  $2.37 \text{ mg L}^{-1}$  a  $25^{\circ}\text{C}$  y su constante de disociación (pKa) es de 4.15 (SRC, 2012).

Por lo anterior, la solución estándar se preparó a una concentración de  $250 \text{ }\mu\text{g mL}^{-1}$ , diluido en 3 mL de etanol y se aforó con agua destilada hasta obtener la concentración mencionada. Se almacenó a  $4^{\circ}\text{C}$  en oscuridad.

### **3.5. EVALUACIÓN DEL EFECTO DEL DICLOFENACO EN EL CRECIMIENTO DE LAS MICROALGAS**

Se realizó una prueba a diferentes concentraciones del diclofenaco para determinar la máxima concentración a la que el fármaco no afecta la cinética de desarrollo con respecto al cultivo control de las microalgas en estudio.

En un tubo falcón de 15 mL se añadieron 8 mL de medio (TAP o Bold) y 1 mL de preinóculo, ajustando la  $OD_{750\text{nm}}$  inicial del cultivo a 0.1. Teniendo un control (cultivo sin diclofenaco) y 6 tubos con concentraciones diferentes del fármaco. Se incubaron a una temperatura de  $25^{\circ}\text{C}$  con agitación continua y fotoperiodo de 16 h luz y 8 h de oscuridad hasta alcanzar la fase estacionaria. Se tomó una alícuota de 1 mL de los cultivos cada 48 h para *C. reinhardtii* CC137 y CC1731 y para el resto de las cepas cada semana para medir la densidad óptica a 750 nm y observar el crecimiento. Las pruebas se realizaron por triplicado.

Las concentraciones seleccionadas para cada fármaco se muestran en la Tabla 9. Estas fueron establecidas con base en análisis previos realizados en el Laboratorio de Biotecnología Molecular de Células Vegetales. La concentración de  $10 \text{ }\mu\text{g mL}^{-1}$  no presentó efecto tóxico en *C. vulgaris*, *N. oculata*, *S. acutus* y *S. obliquus*, mientras que

para *C. reinhardtii* CC137 y *C. reinhardtii* CC1731 la concentración evaluada fue de 5  $\mu\text{g mL}^{-1}$ , sin mostrar efecto nocivo.

**Tabla 9. Concentraciones establecidas de diclofenaco para evaluar su efecto en el crecimiento de las microalgas.**

| Microalgas  | Concentración de diclofenaco<br>( $\mu\text{g mL}^{-1}$ ) |
|---|---|
| <i>C. vulgaris</i><br><i>N. oculata</i>                     | 5, 10, 15, 20, 25, 30                                     |
| <i>S. acutus</i><br><i>S. obliquus</i>                      | 4.4, 8.7, 13.1, 17.5, 21.9, 26.3                          |
| <i>C. reinhardtii</i> CC137<br><i>C. reinhardtii</i> CC1731 | 2.5, 5, 7.5, 10, 12.5, 15                                 |

Este análisis permitirá seleccionar la concentración de diclofenaco que no afecte negativamente el crecimiento de cada una de las microalgas, para los estudios posteriores.

### 3.6. CINÉTICAS DE CRECIMIENTO Y CUANTIFICACIÓN DE CLOROFILA A

En 8 matraces Erlenmeyer de 100 mL se agregaron 70 mL de medio (TAP o Bold) con las concentraciones diferentes de nitrógeno, fósforo y carbono. Esto se realizó en experimentos independientes para las 6 cepas de microalgas, en presencia y ausencia de diclofenaco.

La concentración inicial de diclofenaco para cada especie de microalga en este análisis fue establecida por la prueba indicada en la sección 3.5. A los 8 matraces se les adicionó el volumen necesario para alcanzar la concentración establecida de diclofenaco, posteriormente se agregaron 7 mL de preinóculo con  $\text{OD}_{750\text{nm}}$  de 0.25.

De cada matraz Erlenmeyer se extrajo una muestra de 2.5 mL cada 48 h hasta que los cultivos alcanzaron la fase estacionaria, del volumen tomado del medio de cultivo se utilizaron 400  $\mu\text{L}$  para determinar la densidad óptica por espectrofotometría a 750 nm y así obtener las curvas de crecimiento, lo restante se utilizó para determinar

contenido de *clorofila a* y para la cuantificación del diclofenaco remanente en el medio de cultivo.

Para evaluar si el diclofenaco tiene un efecto en el crecimiento de las microalgas se cuantificó la *clorofila a*, ya que es el principal pigmento fotosintético que proporciona una estimación de la cantidad de biomasa. Este análisis se estandarizó para cada una de las diferentes cepas de microalgas ya que, por su diferencia en la composición de la pared celular, requirieron una metodología diferente (Henriques *et al.*, 2007).

Para *C. vulgaris*, *S. acutus* y *S. obliquus* se tomó 1 mL de muestra, se centrifugó y descartó el sobrenadante, después se realizó un lavado con 1 mL de agua destilada estéril y se añadieron 1.5 mL de metanol absoluto, se calentó por 10 min a 65°C y se incubó por 24 h a 4°C, en condiciones de oscuridad, para favorecer la liberación de clorofila, posteriormente se centrifugaron las muestras para obtener el sobrenadante.

En el caso de *N. oculata* y *C. reinhardtii* CC137 y CC1731 se tomó 1 mL de muestra, se centrifugó y descartó el sobrenadante, después se realizó un lavado con 1 mL de agua destilada estéril y se añadieron 1.5 mL de metanol absoluto, se incubó por 24 h a 4°C, en condiciones de oscuridad, para favorecer la liberación de clorofila, posteriormente se centrifugaron las muestras para obtener el sobrenadante.

Al sobrenadante obtenido en todos los casos se le determinó absorbancia a 652, 665 y 750 nm frente a un blanco de metanol absoluto. Las lecturas se realizaron en un espectrofotómetro UV-Vis (Jenway™ 6705, Cole-Palmer).

Una vez medidas las absorbancias, se llevó a cabo el cálculo de la concentración de *clorofila a*, empleando la ecuación publicada por Porra *et al.*, (1989) expresándose en  $\mu\text{g mL}^{-1}$ :

$$\text{Clorofila } a \left( \frac{\mu\text{g}}{\text{mL}} \right) = [16.29(A_{665} - A_{750}) - 8.54(A_{652} - A_{750})](\text{mL de metanol}) \dots \text{Ec 1}$$

El valor de los coeficientes y la longitud de onda a la que se produce la máxima absorción varían en función del solvente utilizado, en este caso el solvente utilizado fue metanol absoluto.

Para observar la influencia del nitrógeno, fósforo y carbono sobre el crecimiento de las microalgas se realizó un diseño experimental mediante el programa STATISTICA empleando los datos experimentales obtenidos de la cinética de crecimiento y se ajustó un modelo matemático a los datos. Este análisis nos indicó si la presencia de diclofenaco en las diferentes cepas de microalgas inhibe, aumenta o no interfiere con el crecimiento de éstas. Este análisis se realizó por triplicado.

### **3.7. ANÁLISIS POR HPLC PARA EVALUAR LA REMOCIÓN DE FÁRMACOS**

La técnica de HPLC es utilizada para separar los componentes de una mezcla, utilizando una fase estacionaria no polar y una fase móvil que actúa como portador de la muestra. Los componentes de la mezcla interaccionan de forma distinta con ambas fases y de esta manera atraviesan la fase estacionaria a distintas velocidades provocando su separación. Posteriormente pasan por un detector que emite una señal que depende de la concentración y el tipo de compuesto (Malla y Saula, 2015).

Para el análisis de la concentración de los fármacos se tomaron 500  $\mu$ L de cada cultivo, estas muestras se centrifugaron a 13,000 rpm por 5 min, el sobrenadante obtenido se transfirió a otro tubo y se resuspendió en 500  $\mu$ L de etanol al 100% y se agitaron en un vortex a la máxima intensidad, posteriormente se centrifugaron por 5 min.

Posteriormente las muestras se analizaron en un equipo de Cromatografía Líquida de Alta Resolución (HPLC por sus siglas en inglés) Agilent 1260 acoplado a un detector de arreglo de diodos (DAD) y una columna empacada con sílica (C-18) esférica (Agilent, eclipse XDB C-18).

La columna se alimentó con una solución acuosa de ácido trifluoroacético (TFA) al 0.1% (fase móvil A). Se generó un gradiente de acetonitrilo durante un periodo de 10 minutos usando TFA al 0.1% en acetonitrilo (fase móvil B) del 0 al 100%. Finalmente, el equipo se alimentó con la fase móvil A para restaurar las condiciones iniciales de la columna. La detección del diclofenaco se realizó a 275 nm, región en la cual presenta la máxima absorbancia, permitiendo identificar los espectros específicos de los estándares y las unidades de área correspondientes.

Se elaboró una curva de calibración a concentraciones de 0.5, 1, 5, 10 y 15  $\mu\text{g mL}^{-1}$ , utilizando un estándar de diclofenaco (Sigma-Aldrich, SST. Louis, MO, EUA). El volumen de inyección para los estándares fue de 100  $\mu\text{L}$  y el caudal siempre fue de 0.6  $\text{mL min}^{-1}$ . Esta técnica fue estandarizada y validada para el diclofenaco; los análisis para cada muestra, estándar y blancos se realizaron por triplicado.

### **3.8. DETERMINACIÓN DEL MECANISMO DE REMOCIÓN**

Las microalgas, al igual que las plantas, llevan a cabo diferentes mecanismos de captación de compuestos orgánicos e inorgánicos, los adsorben en la pared celular o bien los internalizan en la célula donde los biotransforman o bioacumulan.

Para analizar el porcentaje de diclofenaco removido por el mecanismo de adsorción por las diferentes cepas de microalgas se realizó el siguiente análisis.

#### **3.8.1. Desorción de la pared celular**

Para saber si la remoción del diclofenaco fue debido a la adsorción sobre la pared celular se realizaron lavados a la biomasa de cada microalga, inicialmente con una solución de NaCl 1 M promoviendo la ruptura de las interacciones electrostáticas entre el fármaco y los componentes de la pared celular (como aminoácidos) y posteriormente con una solución de Tween-20 al 0.1% que eliminó interacciones hidrofóbicas (por ejemplo con alginatos).

Para evaluar la desorción de diclofenaco de la pared celular, se tomaron 40 mL de cada cultivo al final de la cinética de crecimiento de las microalgas. El cultivo se centrifugó a 4500 rpm durante 20 min y se desechó el sobrenadante, posteriormente la biomasa se secó a 70°C durante 24 h y se registró el peso seco.

El primer lavado se realizó con NaCl 1 M, agregando 200  $\mu\text{L}$  a la biomasa seca y agitando con vortex durante 30 s. Las muestras se centrifugaron durante 5 min a 13,000 rpm y el sobrenadante se transfirió a un tubo nuevo. Se realizó un segundo lavado al sedimento de microalgas añadiendo 200  $\mu\text{L}$  de una solución Tween-20 al 0.1%. Al sobrenadante recuperado de cada lavado, se añadieron 200  $\mu\text{L}$  de etanol absoluto y se incubaron a 4°C durante 24 h. Finalmente, se centrifugó a 13,000 rpm

durante 5 min y el sobrenadante se analizó por HPLC como se describió anteriormente. El análisis se realizó por triplicado.

### **3.9. DEGRADACION DEL DICLOFENACO POR FOTÓLISIS**

Para evaluar la fotodegradación del diclofenaco, se mantuvieron las mismas condiciones de cultivo que para los experimentos bióticos. Para ello se añadieron 77 mL de medio TAP en matraces Erlenmeyer de 100 mL y el volumen necesario de diclofenaco para obtener la concentración de  $5 \mu\text{g mL}^{-1}$ , mientras que para el medio Basal Bold las concentraciones de diclofenaco usadas fueron  $8.7 \mu\text{g mL}^{-1}$  and  $10 \mu\text{g mL}^{-1}$ .

Los días seleccionados para la toma de muestras corresponden al día final de las cinéticas de crecimiento para cada microalga. Por lo anterior, para la concentración de  $5 \mu\text{g mL}^{-1}$  las muestras se tomaron al día 33, en el caso de la concentración de  $8.7 \mu\text{g mL}^{-1}$  las muestras fueron los días 21 y 25 y, por último, para la concentración de  $10 \mu\text{g mL}^{-1}$ , los días 27 y 29 se tomaron las muestras para su análisis. También se realizó un control manteniendo las mismas condiciones pero en total oscuridad hasta el final de la cinética. Las muestras se analizaron por HPLC, realizando por triplicado este experimento.

### **3.10. ANÁLISIS ESTADÍSTICO**

A partir de los resultados obtenidos, se calcularon las medias y las desviaciones estándar de cada tratamiento y de los controles para todos los parámetros analizados. Para evaluar la remoción de los fármacos y el efecto de éstos en el crecimiento de las microalgas, el experimento fue desarrollado con 3 réplicas biológicas.

Los datos obtenidos en los análisis de Cromatografía líquida de alta resolución fueron interpretados por análisis de varianza de tres factores (ANOVA) a un nivel de 95% de confianza, para analizar la hipótesis de que la concentración estudiada de diclofenaco en el medio no presenta ningún efecto sobre el crecimiento de cada una de las cepas de microalgas en estudio.

En los casos en que esta hipótesis se rechace, se empleará la prueba de comparación de medias por Fisher a un nivel de significación de 0.05 ( $p < 0.05$ ) para analizar de qué forma afectó al parámetro estudiado la concentración del fármaco. Las gráficas se realizaron con el paquete de análisis estadístico y de gráficas avanzadas SigmaPlot versión 12.0. Los resultados se expresaron como la media de los valores obtenidos  $\pm$  desviación estándar.

## CAPITULO V

### 5.1. CONCLUSIONES

- El diclofenaco estimula el crecimiento de las 6 microalgas en un rango de 2.5 a 25  $\mu\text{g mL}^{-1}$ , siendo *C. vulgaris*, la que presentó mayor estimulación. El diclofenaco a una concentración de 30  $\mu\text{g mL}^{-1}$  inhibe el desarrollo de *N. oculata* y en *C. reinhardtii* CC1731 a las concentraciones de 7.5 y 12.5  $\mu\text{g mL}^{-1}$ , sin ser la diferencia estadísticamente significativa con respecto al cultivo control.
- El déficit de carbono, nitrógeno y fósforo no influye en la cinética de crecimiento de *C. vulgaris*, *N. oculata*, *S. acutus* y *S. obliquus*; sin embargo, y debido muy probablemente a la deficiencia de nitrógeno, se observó una disminución en el contenido de *clorofila a* en los cultivos desarrollados en ausencia y presencia del fármaco, siendo *N. oculata* la que mostró un mayor grado de disminución en el contenido del pigmento. La adición del fármaco influye en el contenido de *clorofila a* de las microalgas *C. vulgaris*, *S. acutus* y *S. obliquus*, cuando se presenta déficit de nutrientes.
- El déficit de carbono, nitrógeno y fósforo no influye en las cinéticas de crecimiento de *C. reinhardtii* CC137 y 1731 en ausencia de diclofenaco; sin embargo, la adición de diclofenaco en estas condiciones estimuló el crecimiento en todos los cultivos, mientras que el contenido de *clorofila a* disminuyó alrededor de un 50% en los cultivos con déficit de nutrientes y ausencia de diclofenaco. De forma contraria, los cultivos con déficit de nutrientes y presencia del fármaco mostraron un aumento de aproximadamente un 50% en la concentración del pigmento.
- El porcentaje de remoción de diclofenaco varía de 30 hasta 91% entre las 6 microalgas analizadas. Se obtuvo la mayor remoción en la combinación 100C 50N 100P para *S. obliquus*, mientras que la menor remoción se presentó en la combinación 100C 100N 100P para *C. reinhardtii* CC137. La deficiencia de nutrientes no afectó la remoción de diclofenaco en el medio de cultivo en las 6 microalgas estudiadas.

- Los porcentajes de desorción de diclofenaco de la pared celular de las 6 microalgas fueron de 4.6 a 26%, siendo *S. obliquus* la que mostró el mayor porcentaje de desorción en la combinación 100C 100N 100P, mientras que *C. reinhardtii* CC137 presentó los niveles más bajos de remoción en la combinación 100C 100N 100P. La desorción de diclofenaco en las 6 microalgas por NaCl 1M fue de 2.4 a 15.2%, mientras que el porcentaje del fármaco desorbido por Tween-20 al 0.1% fue de 2.2 a 12.9%, lo cual indica que el diclofenaco fue adsorbido a la pared y membrana celular por interacciones electrostáticas e hidrofóbicas, respectivamente.
- El porcentaje de diclofenaco degradado por fotólisis fue de 15 a 30% en un tiempo de 25 a 37 días de experimentación, mientras que en los experimentos controles (sin microalgas y sin luz) no se presentó cambio en la concentración inicial del diclofenaco. Se infiere que el diclofenaco podría estar interaccionando con compuestos del medio inducido por la presencia de luz, dando lugar a complejos que no absorben a la longitud de onda del diclofenaco en su forma libre.

## CAPITULO VI

### 6.1. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

- Acosta, K. L. (2010). Biodegradación de contaminantes emergentes en columnas empacadas con suelos del Valle de Tula. [Tesis de maestría, Universidad Autónoma de México].
- Aguirre, N., Palacio, J., Correa, I., & Hernández, E. (2007). Ensayos de bioestimulación algal con diferentes relaciones nitrógeno-fósforo, bajo condiciones de laboratorio. *Revista Ingenierías*, 6(11), 11-21. Recuperado de: <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=75061102>
- Ajayan, K. V., Selvaraju, M., Unnikannan, P., & Sruthi, P. (2015). Phycoremediation of tannery wastewater using microalgae *Scenedesmus* species. *International Journal of Phytoremediation*, 17(10), 907–916. doi: 10.1080/15226514.2014.989313
- Amaya, A. E. & Sarmiento, R. J. (2010). Desarrollo de una metodología para la extracción de aceite de microalgas con etanol/hexano empleando disrupción celular térmica y química. [Tesis de licenciatura, Universidad Industrial de Santander].
- Arrieta, E. R. (2008). Aplicaciones biotecnológicas de las microalgas. *Revista del Colegio de Microbiólogos y Químicos Clínicos de Costa Rica*, 14 (1), 1-6.
- aus der Beek, T., Weber, F.A., Bergmann, A., Hickmann, S., Ebert, I., Hein, A., & Küster, A. (2016). Pharmaceuticals in the environment-Global occurrences and perspectives. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 35(4), 823–835. doi: 10.1002/etc.3339
- Baker, A. L. (2012). Phycokey -- an image based key to Algae (PS Protista), Cyanobacteria, and other aquatic objects. University of New Hampshire Center for Freshwater Biology. Recuperado de: <http://cfb.unh.edu/phycokey/phycokey.htm>

- Ballen-Segura, M., Hernández Rodríguez, L., Parra Ospina, D., Vega Bolaños, A., & Pérez, K. (2016) Using *Scenedesmus sp.* for the phycoremediation of Tannery wastewater. *Tecciencia*, 11(21), 69–75. doi: 10.18180/tecciencia.2016.21.11
- Barsanti, L. & Gualtieri, P. (2014). *Algae: anatomy, biochemistry and biotechnology*. Florida: CRC press.
- Behera, S. K., Kim, H. W., Oh, J. E. & Park, H. U. (2011). Occurrence and removal of antibiotics, hormones and several other pharmaceuticals in wastewater treatment plants of the largest industrial city of Korea. *Science and Total Environment*, 409 (20), 4351-4360. doi: 10.1016/j.scitotenv.2011.07.015
- Ben-Ouada, S., Ben-Ali, R., Cimetiere, N., Leboulanger, C., Ben-Ouada, H. & Sayadi, S., (2019). Biodegradation of diclofenac by two green microalgae: *Picocystis sp.* y *Graesiella sp.* *Ecotoxicology and Environmental Safety*. 186(2019), 109769. doi: 10.1016/j.ecoenv.2019.109769
- Benavente-Valdés, J. R., Montañez, J. C., Aguilar, C. N. & Méndez-Zavala, A. (2012) Tecnología de cultivo de microalgas en fotobiorreactores, *Revista Científica de la Universidad Autónoma de Coahuila*. 4(7).
- Bermeo, L. (2011). Estudio del cosechado de cultivos de microalgas en agua residual mediante técnicas de centrifugado. [Tesis de pregrado, Universidad de Cádiz].
- Bolling, C. & Fiehn, O. (2005). Metabolite profiling of *Chlamydomonas reinhardtii* under nutrients deprivation. *Plant Physiology*, 139 (4), 1995-2005. doi: 10.1104/pp.105.071589
- Bolong, N., Ismail, A. F., Salim, M. R. & Matsuura, T. (2009). A review of the effects of emerging contaminants in wastewater and options for their removal. *Desalination*, 239(1-3), 229-246. doi: 10.1016/j.desal.2008.03.020
- Bonnefille, B., Courant, F. & Gomez, E. (2018). Diclofenac in the marine environment: A review of its occurrence and effects. *Marine Pollution Bulletin*, 131(Part A), 496-506. doi: 10.1016/j.marpolbul.2018.04.053
- Boom, A., Sinnige, J. S. & de Leeuw, J. W. (2005). Cutan, a common aliphatic biopolymer in cuticles of drought-adapted plants. *Organic Geochemistry Journal*, 36, 595–601. doi: 10.1016/j.orggeochem.2004.10.017

- Bui, T. & Choi, H. (2010). Influence of ionic strength, anions, cations, and natural organic matter on the adsorption of pharmaceuticals to silica. *Chemosphere*, 80(7), 681-686. doi: 10.1016/j.chemosphere.2010.05.046
- Butusov, M. & Jernelöv, A. (2013) *Phosphorus in the Organic Life: Cells, Tissues, Organisms*. New York: Springer,
- Cai, T., Park, S. Y. & Li, Y. (2013). Nutrient recovery from wastewater streams by microalgae: Status and prospects, *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 19, 360–369. doi: 10.1016/j.rser.2012.11.030
- Carmona, A. D. (2012). Estudio de absorción de anti-inflamatorios no esteroidales en plantas de trigo y adsorción en suelos de la región metropolitana. [Tesis de licenciatura, Universidad de Chile].
- Catalá, L. (2013). Contribución al estudio del crecimiento y las posibilidades del aprovechamiento termoquímico de las microalgas *Nannochloropsis Gaditana* y *Nannochloropsis Oculata*. [Tesis de doctorado, Universidad de Alicante].
- Cid, A. (2015). Toxicidad ejercida por el triclosán sobre la microalga dulceacuícola *Chlamydomonas moewusii* Gerloff. [Tesis de licenciatura, Universidad de Coruña].
- Cleuvers M. (2003). Aquatic ecotoxicity of pharmaceuticals including the assessment of combination effects. *Toxicology Letters*, 142(3), 185-194. doi: 10.1016/S0147-6513(03)00141-6
- Corbacho, A. (2018). Eliminación de contaminantes emergentes en agua residual para su posterior reutilización. [Tesis doctoral, Universidad de Cádiz].
- Cota, K. M. (2019). Efecto de la limitación de nutrientes en la composición bioquímica de *Ettlia oleabundans* y su potencial en la producción de compuestos de alto valor agregado. [Tesis de Maestría, Centro de Investigaciones Biológicas del Noreste, S.C.].
- Cruz-Guzmán, M. (2007). *La contaminación de suelos y aguas. Su prevención con nuevas sustancias naturales*. Sevilla: Editorial Universidad de Sevilla-Secretariado de Publicaciones.

- De Wilt, A., Butkovski, A., Tuantet, K., Hernández, L., Fernandes, T. V., Langenhoff, A. & Zeeman, G. (2016). Micropollutant removal in an algal treatment system fed with source separated wastewater streams. *Journal of Hazardous Materials*, 304, 84-92. doi: 10.1016/j.jhazmat.2015.10.033
- Dietrich, D. R., & Prietz, A. (1999). Fish embryotoxicity and teratogenicity of pharmaceuticals, detergents and pesticides regularly detected in sewage treatment plant effluents and surface waters. *Toxicologist*, 48(1-S), 151.
- Dietz, A. & Schnoor, J. (2001). Advances in phytoremediation. *Environmental Health Perspectives*, 109(1), 163-168. doi: 10.1289/ehp.01109s1163
- Ding, T., Yang, M., Zhang, J., Yang, B., Lin, K., Li, J. & Gan, J. (2017). Toxicity, degradation and metabolic fate of ibuprofen on freshwater diatom *Navicula* sp. *Journal of Hazardous Materials*, 330, pp. 127-134. doi: 10.1016/j.jhazmat.2017.02.004
- Dougherty, J., Swarzenski, P., Dinicola, R. & Reinhard, M. (2010). Occurrence of herbicides and pharmaceutical and personal care products in surface water and groundwater around Liberty Bay, Puget Sound, Washington. *Journal of Environmental Quality*, 39(4), 1173-1180. doi: 10.2134/jeq2009.0189
- Ebele, A. J., Abou-Elwafa Abdallah, M. & Harrad, S. (2017). Pharmaceuticals and personal care (PPCPs) in the freshwater aquatic environment. *Emerging Contaminants*, 3(1), 1-16. doi: 10.1016/j.emcon.2016.12.004
- Escapa, C., Nuno, R., Paniagua, S., García, A., & Otero, M. (2017). Comparative assessment of pharmaceutical removal from wastewater by the microalgae *Chlorella sorokiniana*, *Chlorella vulgaris* y *Scenedesmus obliquus*. *Biological Wastewater Treatment and Resource Recovery*, Robina Farooq and Zaki Ahmad. *IntechOpen*, 99–117. . doi: 10.5772/66772
- Farré, La M., Pérez, S., Lantiani, L. & Barceló, D. (2008). Fate and toxicity of emerging pollutants, their metabolites and transformation products in the aquatic environment. *Trends in Analytical Chemistry*, 27(11), 991-1007. doi: 10.1016/j.trac.2008.09.010

- Fatta-Kassinou D., Hapeshi E., Achilleos A., Meric S., Gros M., Petrovic M. & Barcelo D. (2011). Existence of pharmaceutical compounds in tertiary treated urban wastewater that is utilized for reuse applications. *Water Resources Management*, 25(4), 1183-1193. doi: 10.1007/s11269-010-9646-4
- Fawley, K. P. (2007). Observations on the diversity and ecology of freshwater *Nannochloropsis* (*Eustigmatophyceae*), with descriptions of new taxa. *Protist*, 158(3), 325-336. doi: 10.1016/j.protist.2007.03.003
- Ferreira, V. S., Rocchetta, L., Conforti, V., Bench, S., Feldman, R. & Levin, M. (2007). Gene expression patterns in *Euglena gracilis*: Insights into the cellular response to environmental stress. *Gene*, 389(2), 136-145. doi: 10.1016/j.gene.2006.10.023
- Flemming, H. C. & Wingender, J. (2010). The biofilm matrix. *Nature Reviews Microbiology*, 8, 623-633. doi: 10.1038/nrmicro2415
- Foflonker, F., Ananyev, G., Qiu, H., Morrison, A., Palenik, B., Dismukes, G. C. & Bhattacharya, D. (2016). The unexpected extremophile: Tolerance to fluctuating salinity in the green alga *Picochlorum*. *Algal Research*, 16, 465-472. doi: 10.1016/j.algal.2016.04.003
- Forján Lozano, E., Vílchez Lobato, C. & Vega Piqueres, J. M. (2014) *Bioteconología de microalgas*. España: Ed. Eduardo Forjan Lozano.
- García, R. (2014). Producción de biomasa de microalgas rica en carbohidratos acoplada a la eliminación fotosintética de CO<sub>2</sub>. [Tesis de doctorado, Universidad de Sevilla].
- Gelin, F., Volkman, J. K., deLeeuw, J. W. & Damsté, J. S. (1997). Mid-chain hydroxy long-chain fatty acids in microalgae from the genus *Nannochloropsis*. *Phytochemistry*, 45(4), 641–646. doi: 10.1016/S0031-9422(97)00068-X
- Gerbaldo, M., Crivello, M., Mendieta, S. & Elías, V. (2019). Degradación de contaminantes emergentes presentes en efluentes acuáticos, empleando catalizadores tipo ferritas. *Actas de Jornadas y Eventos Académicos de Universidad Tecnológica Nacional*, 4. doi: 10.33414/ajea.4.383.2019

- González, S., Müller, J., Petrovic, M., Barceló, D., & Knepper T. P. (2006). Biodegradation studies of selected priority acidic pesticides and diclofenac in different bioreactors. *Environmental Pollution*, 144(3), 926-932. doi: 10.1016/j.envpol.2006.02.021
- Gonzalez-Gonzalez, L. M. (2010). Influencia de la deficiencia de nitrógeno y fósforo en las interacciones competitivas entre *Chlorella vulgaris* y *Scenedesmus acutus*. [Tesis de Maestría, Universidad Nacional de Colombia].
- Griesbeck, C., Kobl, I., & Heitzer, M. (2006). *Chlamydomonas reinhardtii*. A protein expression system for pharmaceutical and biotechnological proteins. *Molecular biotechnology*, 34(2), 213-223. doi: 10.1385/MB:34:2:213
- Gröner, F., Höhne, C., Kleiner, W., & Kloas, W. (2017). Chronic diclofenac exposure affects gill integrity and pituitary gene expression and displays estrogenic activity in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Chemosphere*, 166, 473-481. doi: 10.1016/j.chemosphere.2016.09.116
- He, B. S., Wang, J., Liu, J. & Hu, X. M. (2017). Eco-pharmacovigilance of non-steroidal antiinflammatory drugs: Necessity and opportunities. *Chemosphere*, 181, pp. 178-189. doi: 10.1016/j.chemosphere.2017.04.084
- Heberer, T. (2002). Tracking persistent pharmaceutical residues from municipal sewage to drinking water. *Journal of Hydrology*, 266(3-4), 175-189. doi: 10.1016/S0022-1694(02)00165-8
- Henriques, M., Silva, A. & Rocha, J. (2007). Extraction and quantification of pigments from a marine microalga: a simple and reproducible method. *Communicating Current Research and Educational Topics and Trends in Applied Microbiology Formatex*, 586-593.
- Hernández-Pérez, A. & Labbé, J. I. (2014). Microalgas, cultivos y beneficios. *Revista de Biología Marina y Oceanografía*, 49(2), 157-173. doi: 10.4067/S0718-19572014000200001
- Hu, H. & Gaol, K. (2003). Optimization of growth and fatty acid composition of a unicellular marine picoplankton, *Nannochloropsis* sp., with enriched carbon sources. *Biotechnology Letters*, 25: 421–425. doi: 10.1023/A:1022489108980

- Institute of Hidrobiology (2013). Freshwater Algae Culture Collection. Recuperado de: <http://algae.ihb.ac.cn/english/algaeDetail.aspx?id=186>
- IWW (2014). Pharmaceuticals in the environment: Occurrence, effects, and options for action. Alemania: German Environment Agency. Recuperado de: [https://www.umweltbundesamt.de/sites/default/files/medien/378/publikationen/pharmaceuticals\\_in\\_the\\_environment\\_0.pdf](https://www.umweltbundesamt.de/sites/default/files/medien/378/publikationen/pharmaceuticals_in_the_environment_0.pdf)
- Jeffree, C. E. (2007). The fine structure of the plant cuticle. *Annual plant reviews*, 23, 11–125. doi: 10.1002/9780470988718.ch2
- Karlson, B., Andreasson, A., Johansen, M., Karlberg, M., Loo, A., & Skjevik, AT. (2020). Nordic Microalgae. *Publicación electrónica mundial*. Recuperado de: <http://nordicmicroalgae.org>
- Khozin-Goldberg, I. & Cohen, Z. (2006). The effect of phosphate starvation on the lipid and fatty acid composition of the fresh water eustigmatophyte *Monodus subterraneus*. *Phytochemistry*, 67, 696-701. doi: 10.1016/j.phytochem.2006.01.010
- Kojima, H. & Lee K. (2001). *Photosynthetic microorganisms in Environmental Biotechnology*. Hong-Kong: Springer-Verlag.
- Kumar S. K., Dahms H. U., Won E. J., Lee J. S. & Shin K. H. (2015). Microalgae- A promising tool for heavy metal remediation. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 113, 329-352. . doi: 10.1016/j.ecoenv.2014.12.019
- Kûmmerer, K. (2008). Pharmaceuticals in the environment – a brief summary. Pharmaceuticals in the environment – Sources, fate, effects and risks. *Springer-Verlag*. 1-21. doi: 10.1007/978-3-662-09259-0
- Lee, J., Ji, K., Lim Kho, Y., Kim, P., & Choi, K. (2011). Chronic exposure to Diclofenac on two freshwater cladocerans and *Japanese medaka*. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 74(5), 1216-25. doi: 10.1016/j.ecoenv.2011.03.014
- Lee, Y. K. & Kojima, H. (2001). *Photosynthetic microorganisms in environmental biotechnology*. Berlin: Springer Berlin Heidelberg.
- León-Saiki, G. M. L. (2018). Role of starch in *Tretradesmus obliquus*. [Tesis doctoral, Wageningen University].

- Li, Q.C., Fu, L., Wang, Y., Zhou, D.D., & Rittmann, B.E. (2018). Excessive phosphorus caused inhibition and cell damage during heterotrophic growth of *Chlorella regularis*. *Bioresource Technology*, 268, 266-270. doi: 10.1016/j.biortech.2018.07.148
- Liu, Y., Guan, Y.T., Gao, Q.T., Tam, N.F.Y. & Zhu, W.P. (2010). Cellular responses, biodegradation and bioaccumulation of endocrine disrupting chemicals in marine diatom *Navicula incerta*. *Chemosphere*, 80(5), 592-599. doi: 10.1016/j.chemosphere.2010.03.042
- Lonappan, L., Kaur Brar, S., Kumar Das, R., Verma, M. & Surampalli, R. (2016). Diclofenac and its transformation products: environmental occurrence and toxicity- A review. *Environmental International*, 96, 127-138. doi: 10.1016/j.envint.2016.09.014
- López, A. R. (2014). Producción de lactostatina en cloroplastos de *Chlamydomonas reinhardtii*. [Tesis de maestría, Universidad Autónoma de Aguascalientes].
- Lubián, L. M. (1982). Ultraestructura y pigmentos de algunas Chlorophyceae y Eustigmatophyceae planctónicas de morfología similar. *Collectanea botánica*, 13(2), 873-880.
- Luo, Y., Guo, W., Hao, H., Duc, L., Ibney, F., Zhang, J., Liang, S. & Wang, X. (2014). A review on the occurrence of micropollutants in the aquatic environment and their fate and removal during wastewater treatment. *Science of the Total Environment*, 473-474, 619-641. doi: 10.1016/j.scitotenv.2013.12.065
- Maes, H. M., Maletz, S. X., Ratte, H. T., Hollender, J. & Schaeffer, A. (2014). Uptake, Elimination, and Biotransformation of 17 $\alpha$ -Ethinylestradiol by the Freshwater Alga *Desmodesmus subspicatus*. *Environmental Science and Technology*, 48(20), 12354-12361. doi: 10.1021/es503574z
- Malla, A. C. & Saula, S. V. (2015). Determinación del metabolito tóxico Aflatoxina M<sub>1</sub> en leches cruda, pasteurizada y ultrapasteurizada consumidas en la ciudad de Cuenca mediante la técnica de cromatografía líquida de alta resolución (HPLC). [Tesis de licenciatura, Universidad de Cuenca].

- Markou, G. & Georgakakis, D. (2011). Cultivation of filamentous cyanobacteria (blue-green algae) in agro-industrial wastes and wastewaters: A review. *Reviews in Environmental Science and Biotechnology*, 12(2), 119-130. doi: 10.1016/j.apenergy.2010.12.042
- Martínez, C., Blanco, G., García, E. & Agúndez, J. (2006). Farmacogenómica clínica de CYP2C8 y CYP2C9: conceptos generales y aplicación al uso de AINE. *Farmacia Hospitalaria*, 30(4), 240-248. doi: 10.1016/S1130-6343(06)73982-4
- Martínez, M., Sánchez, S., Jiménez, J. & Muñoz, L. (2000). Nitrogen and phosphorus removal from urban wastewater by the microalga *Scenedesmus obliquus*. *Bioresource Technology*, 73, 263-272. doi: 10.1016/j.btre.2016.04.003
- Matamoros, V., Gutierrez, R., Ferrer, I., García, J. & Bayona, J. (2015). Capability of microalgae-based wastewater treatment systems to remove emerging organic contaminants: A pilot-scale study. *Journal of Hazardous Materials*, 288(2015), 34-42. doi: 10.1016/j.jhazmat.2015.02.002
- McCutcheon, S. & Schnoor, J. (2003). Overview of phytotransformation and control of wastes. *Phytoremediation: Transformation and control of contaminants*. Wiley, New York. 3-58 pp. doi: 10.1002/047127304X.ch1
- McGettigan, P. & Henry, D. (2013). Use of non-steroidal anti-inflammatory drugs that elevate cardiovascular risk: an examination of sales and essential medicines lists in low-, middle-, and high- income countries. *PLoS Medicine*, 10(2), e1001388. doi: 10.1371/journal.pmed.1001388
- Mehrabadi, A., Craggs, R. & Farid, M. (2015). Tratamiento de aguas residuales de alta tasa de estanques de algas (WWT HRAP) para la producción de biocombustibles de bajo costo. *Bioresource Technology*, 184, 202-214. doi: 10.1016/j.biortech.2014.11.004
- Meng, X., Yang, X., Xu, X., Zhang, L., Nie, Q. & Xian, M. (2009). Biodiesel production from oleaginous microorganisms. *Renewable Energy*, 34(1), 1-5. doi: 10.1016/j.renene.2008.04.014
- Montes, J. P. & Pulido, M. (2012). Obtención de protocolos para el aislamiento, cultivo y extracción de ADN de *Chlorella vulgaris* Beyerinck. *El astrolabio*, 11(2), 47-54.

- Morales, N. X. (2012). Estudio del efecto de la incorporación de biosólidos sobre la movilidad de anti-inflamatorios no esteroideos en suelos de la Región Metropolitana. [Tesis de licenciatura, Universidad de Chile].
- Moronta, R., Mora, R. & Morales, E. (2006). Respuesta de la microalga *Chlorella sorokiniana* al pH, salinidad y temperatura en condiciones axénicas y no axénicas. *Revista de la Facultad de Agronomía de la Universidad de Zulia.*, 23(1), 28-43.
- Mus, F., Dubini, A., Seibert, M., Posewitz, M. C. & Grossman, A. R. (2007). Anaerobic acclimation in *Chlamydomonas reinhardtii*: Anoxic gene expression, hydrogenase induction, and metabolic pathways. *Journal of Biological Chemistry*, 282(35), 25475-25486. doi: 10.1074/jbc.M701415200
- Nájera, H. A., Miceli, A. S., Rojas, M. N., Quintero, L. I. & Orantes, C. (2014). Revisión de tecnologías para el tratamiento de aguas residuales incluyendo algunos fármacos. *Innovación y desarrollo*, 3, 73-95. doi: 10.31644/IMASD.5.2014.a04
- Navarro-Aviñón, J., Aguilar, I. & López, J. (2007). Aspectos bioquímicos y genéticos de tolerancia y acumulación de metales pesados en plantas. *Revista científica de ecología y medio ambiente*, 16(2), 10-25. Recuperado de: <https://www.redalyc.org/articulo.oa?id=540/54016203>
- Nicolaou, A., Meric, S. & Fatta, D. (2007). Occurrence pattern of pharmaceuticals in water and wastewater environments. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 387(4), 1225-1234. doi: 10.1007/s00216-006-1035-8
- Oaks, J. L., Gilbert, M., Virani, M. Z., Watson, R. T., Meteyer, C. U., Rideout, B. A., 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(6975), 630-633. doi: 10.1038/nature02317
- Olivares, E. (2010). Producción de aceite para usos industriales a partir de la microalga "*Scenedesmus obliquus*". [Tesis de licenciatura, Universidad de El Salvador].

- Otto, B. & Schlosser, D. (2014). First laccase in green algae: purification and characterization of an extracellular phenol oxidase from *Tetracystis aeria*. *Planta*, 240, 1225-1236. doi: 10.1007/s00425-014-2144-9
- Pal, D., Khozin-Goldberg, I., Cohen, Z. & Boussiba, S. (2011). The effect of light, salinity, and nitrogen availability on lipid production by *Nannochloropsis* sp. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 90(4), 1429–1441. doi: 10.1007/s00253-011-3170-1
- Parkinson, A., & Ogilvie, B. (2008). *Biotransformation of xenobiotics*. New York: Ed. McGraw-Hill.
- Peng, F. Q., Ying, G. G., Yang, B., Liu, S., Lai, H. J., Chen, Z. F. & Zhou, G. J. (2014). Biotransformación of progesterone and norgestrel by two freshwater microalgae (*Scenedesmus obliquus* and *Chlorella pyrenoidosa*): Transformation kinetics and products identification. *Chemosphere*, 95, 581-588. doi: 10.1016/j.chemosphere.2013.10.013
- Pérez, J. (2016). Fármacos como contaminantes emergentes: Caracterización, cuantificación y eliminación en plantas de tratamiento de aguas residuales. [Tesis doctoral, Universidad de Oviedo].
- Pérez, L. (2019). Optimización de las operaciones de separación de biomasa algal. [Tesis doctoral, Universidad de Vigo].
- Petrovic M., González S., & Barceló D. (2003). Analysis and removal of emerging contaminants in wastewater and drinking water. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 22(10), 685–696. doi: 10.1016/S0165-9936(03)01105-1
- Phycospectrum (2009). JABU. *Journal of Algas Biomass Utilization*. ISSN: 2229-6905
- Phytocontrol. (2020). *Opinión ANSES Diclofenaco en Aguas para Consumo Humano - Phytocontrol*. [online] [Accessed 19 Feb. 2020]. Recuperado de: <http://www.phytocontrol.com/es/vigilancia-reglementaria/opinion-anses-diclofenaco-en-aguas-para-consumo-humano/>
- Pilon-Smits, E. (2005). Phytoremediation. *Annual Review of Plant Biology*, 56, 15-39. doi: 10.1146/annurev.arplant.56.032604.144214

- Porra, R. J., Thompson, W. A. & Kriedemann, P. E. (1989). Determination of accurate extinction coefficients and simultaneous equations for assaying chlorophylls a and b extracted with four different solvents: verification of the concentration of Chlorophyll standards by atomic absorption spectroscopy. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)- Bioenergetics*, 975(3), 384-394. doi: 10.1016/S0005-2728(89)80347-0
- Prieto-Rodríguez, L., Miralles-Cuevas, S., Oller, I., Agüera, A., Li-Puma, G. & Malato, S. (2012). Treatment of emerging contaminants in wastewater treatment plants (WWTP) effluents by solar photocatalysis using low TiO<sub>2</sub> concentrations. *Journal of Hazardous Materials*, 211-212, 131-137. doi: 10.1016/j.jhazmat.2011.09.008
- Pulz, O. & Scheinbenbogan, K. (1998). Photobioreactors: design and performance with respect to light energy input. *Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology*, 59, 123-152. doi: 10.1007/BFb0102298
- Quiroga, J., Quero-Pastor, M. & Acevedo, A. (2015). Tratamientos avanzados para la eliminación de fármacos en aguas superficiales. *Revista Salud Ambiental*, 15, 12-64.
- Ramos, C. (2009). Medicamentos de consumo humano en el agua, propiedades físico-químicas. *Revista Cubana de Higiene y Epidemiología*. *Obtenido de Revista Cubana de Higiene y Epidemiología*, 47(2). Recuperado de: [http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S1561-30032009000200008&lng=es&tlng=es](http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1561-30032009000200008&lng=es&tlng=es)
- Rauch-Williams, T., Hoppe-Jones, C. & Drewes, J. E. (2010). The role of organic matter in the removal of emerging trace organic chemicals during managed aquifer recharge. *Water Research*, 44(2), 449-460. doi: 10.1016/j.watres.2009.08.027
- Rawat, I., Ranjith, R., Mutanda, T. & Bux, F. (2011). Dual role of microalgae: Phycoremediation of domestic wastewater and biomass production for sustainable biofuels production. *Applied Energy*, 88(10), 3411-3424. doi: 10.1016/j.apenergy.2010.11.025

- Reboloso, M. M., Camacho, F., Navarro, A. & Guil, J. (2001). Biomass nutrient profiles of the microalga *Nannochloropsis*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 49(6), 2966-2972. doi: 10.1021/jf0010376
- Rivera-Solís, R., Peraza, S. & Herrera, V. (2011). La microalga verde *Chlamydomonas reinhardtii*: nueva alternativa para la producción de proteínas recombinantes de interés médico. *Ciencia*. Recuperado de: [http://www.revistaciencia.amc.edu.mx/online/720\\_MICROALGA.pdf](http://www.revistaciencia.amc.edu.mx/online/720_MICROALGA.pdf)
- Roberts, J. & Morrow, J. (2007). *Las bases farmacológicas de la terapéutica*. México: Ed. Mac Graw Hill.
- Roberts, P. H. & Thomas, K. V. (2006). The occurrence of selected pharmaceuticals in wastewater effluent and surface waters of the lower Tyne catchment. *The Science of the Total Environment*, 356(1-3), 143-153. doi: 10.1016/j.scitotenv.2005.04.031
- Robledo, V. H., Velázquez, M. A., Montañez, J. L., Pimentel, J. L., Vallejo, A. A., López, M. D. & Venegas J. (2017). Hidroquímica y contaminantes emergentes en aguas residuales urbano industriales de Morelia, Michoacán, México. *Revista Internacional de Contaminación Ambiental*, 33(2), 221-235. doi: 10.20937/RICA.2017.33.02.04
- Rodolfi, L. & Zittelli, G. (2009). Microalgae for oil: Strain selection, induction of lipid synthesis and outdoor mass cultivation in a low-cost photobioreactor. *Biotechnology and Bioengineering*, 102, 100-112. doi: 10.1002/bit.22033
- Rodríguez, R. L. (2010). Influencia de los fármacos presentes en el agua residual sobre la resistencia de la bacteria *Escherichia coli* y su eliminación por oxidación avanzada. [Tesis de doctorado, CONACyT].
- Roig, J. D. (2013). Eliminación de contaminantes emergentes mediante Humedales Artificiales como sistema alternativo o complementario a un tratamiento de aguas convencional. [Tesis de maestría, Universidad Politécnica de Valencia].
- Ruiz, A. (2011). Puesta en marcha de un cultivo de microalgas para la eliminación de nutrientes de un agua residual urbana previamente tratada anaeróbicamente. [Tesis de maestría, Universidad Politécnica de Valencia].

- Ruiz-Marin, A., Mendoza-Espinosa, L.G. & Stepherson, T. (2010). Growth and nutrient removal in free and immobilized green algae in batch and semi-continuous cultures treating real wastewater. *Bioresource Technology*, 101(1), 58-64. doi: 10.1016/j.biortech.2009.02.076
- Salt, D., Smith, R. & Raskin, I. (1998). Phytoremediation. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, 49, 643-668. doi: 10.1146/annurev.arplant.49.1.643
- Sánchez-Varo, R. (1995). Biotecnología de microalgas. [Tesis de licenciatura, Universidad de California].
- Santos, J. L., Aparicio, I. & Alonso, E. (2007). Occurrence and risk assessment of pharmaceutically active compounds in wastewater treatment plants. A case study: Seville City (Spain). *Environment International*, 33(4), 596-601. doi: 10.1016/j.envint.2006.09.014
- Sathishkumara, P., Alias Meenab, R. A., Palanisamic, T., Ashokkumard, V., Palvannane, T. & Long Gu, F. (2020). Occurrence, interactive effects and ecological risk of diclofenac in environmental compartments and biota - a review. *Science of The Total Environment*, 698, 134057. doi: 10.1016/j.scitotenv.2019.134057
- Scaife, M. A., Nguyen, G., Rico, J., Lambert, D., Helliwel, K. E. & Smith, A. G. (2015). Establishing *Chlamydomonas reinhardtii* as an industrial biotechnology host. *Plant Journal*, 82(3), 532-46. doi: 10.1111 / tpj.12781
- Schwaiger, J., Ferling, H., Mallow, U., Wintermayr, H. & Negele, R. D. (2004). Toxic effects of the non-steroidal anti-inflammatory drug diclofenac Part I: histopathological alterations and bioaccumulation in rainbow trout. *Aquatic Toxicology*, 68(2), 141-150. doi: 10.1016/j.aquatox.2004.03.014
- Sharma, K. & Kaushik, G. (2017). NSAIDS in the environment: From emerging problem to green solution. *Annals of Pharmacology and Pharmaceutics*, 2(14), 1-3. doi: 10.1007/s10661-020-8161-1
- SRC PhysProp Database (2012). Base de datos de propiedades físicas. Recuperado de: <https://esc.syrres.com/fatepointer/search.asp>

- Stephens, E., Ross, I., Mussnug, J., Wagner, L., Borowitzka, M., Posten, C., Kruse, O. & Hankamer, B. (2010). Future prospects of microalgal biofuels production systems. *Trends in Plant Science*, 15(10), 554-564. doi: 10.1016/j.tplants.2010.06.003
- Stottmeister, U., Wiebner, A., Kusch, P., Kappelmeyer, U., K stner, M., Bederski, O., M ller, R. & Moormann, H. (2003). Effects of plants and microorganisms in constructed wetlands for wastewater treatment. *Biotechnology Advances*, 22(1-2), 93-117. doi: 10.1016/j.biotechadv.2003.08.010
- Su, C. H., Fu, C. C., Chang, Y. C., Nair, G. R., Ye, J. L., Chu, I. M. & Wu, W. T. (2008). Simultaneous estimation of chlorophyll a and lipids contents in microalgae by three-color analysis. *Biotechnology and Bioengineering*, 99, 1034-1039. doi: 10.1002/bit.21623
- Ternes T.A., Janex-Habibi M.J., Knacker T., Kreuzinger N., & Siegrist H. (2004). *Assessment of technologies for the removal of pharmaceuticals and personal care products in sewage and drinking water facilities to improve the indirect potable water reuse*. (Contract No. EVKI-CT-2000-00047). Alemania: Federal Institute of Hydrology.
- Thies, F., Backhaus, B., Bossman, B. & Grimme, L. H. (1996). Xenobiotic biotransformation in unicellular green algae (Involvement of cytochrome P450 in the activation and selectivity of the pyridazinone pro-herbicide metflurazon. *Plant Physiology*, 112(1), 361-370. doi: 10.1104/pp.112.1.361
- Tixier, C., Singer, H. P., Oellers, S. & M ller, S.R. (2003). Occurrence and fate of carbamazepine, clofibric acid, diclofenac, ibuprofen, ketoprofen, and naproxen in surface waters. *Environmental Science and Technology*, 37(6), 1061-1068. doi: 10.1021/es025834r
- UTEX (2021). Culture collection of algae at the University of Texas at Austin. Recuperado de: <https://utex.org/products/utex-0026?variant=30991239970906>
- Valdés, A. (2009). *Evaluación de la toxicidad producida por diclofenaco sobre Daphnia magna*. [Tesis de maestría, Instituto Politécnico Nacional].

- Van Vooren, G., Le Grand, F., Legrand, J., Cuine, S., Peltier, G. & Pruvost, J. (2012). Investigation of fatty acids accumulation in *Nannochloropsis oculata* for biodiesel application. *Bioresource Technology*, 124, 421- 432. doi: 10.1016/j.biortech.2012.08.009
- Verlicchi, P., Al Aukidya, M. & Zambello, E. (2012). Occurrence of pharmaceutical compounds in urban wastewater: Removal, mass load and environmental risk after a secondary treatment—A review. *Science of the Total Environment*, 429, pp. 123-155. doi: 10.1016/j.scitotenv.2012.04.028
- Vienno, N. & Sillanpää, M. (2014). Fate of diclofenac in municipal wastewater treatment plant—a review. *Environment International*, 69, 28-39. doi: 10.1016/j.envint.2014.03.021
- Wang, S. B., Chen, F., Sommerfeld, M. & Hu, Q. (2004). Proteomic analysis of molecular response to oxidative stress by the green alga *Haematococcus pluvialis* (Chlorophyceae). *Planta*, 220, 17-29. doi: 10.1007/s00425-004-1323-5
- Wehr, J. D. (2007). Algae: Anatomy, biochemistry and biotechnology by Barsanti, L. & Gualtieri, P. *Journal of Phycology*, 43(2), 412-414. doi: 10.1111/j.1529-8817.2007.00335.x
- Westerhoff, P., Yoon, Y., Snyder, S. & Wert, E. (2005). Fate of endocrine-disrupter, pharmaceuticals and personal care product chemicals during simulated drinking water treatment process. *Environmental Science and Technology*, 39(17), 6649-6663. doi: 10.1021/es0484799
- Wu, G., Geng, J., Li, S., Li, J., Fu, Y., Xu, K., Ren, H. & Zhang, X. (2019) Abiotic and biotic processes of diclofenac in enriched nitrifying sludge: Kinetics, transformation products and reactions. *The Science of the Total Environment*, 683, 80-88. doi: 10.1016/j.scitotenv.2019.05.216
- Wu, J., Zhang, Y., Luo, X., She, Y., Yu, L., Chen, S. & Mai, B. (2012). A review of polybrominated diphenyl ethers and alternative brominated flame retardants in wildlife from China: Levels, trends, and bioaccumulation characteristics. *Journal of Environmental Sciences*, 24(2), 183-194. doi: 10.1016/s1001-0742(11)60758-4

- Xiao, R. & Zheng, Y. (2016). Overview of microalgal extracellular polymeric substances (EPS) and their applications. *Biotechnology Advances*, 34(7), 1225-1244. doi: 10.1016/j.biotechadv.2016.08.004
- Xiong, J. Q., Kurade, M. B., Abou-Shanab, R. A. I., Ji, M. K., Choi, J., Kim, J. O. & Jeon, B. H. (2016). Biodegradation of carbamazepine using freshwater microalgae *Chlamydomonas mexicana* and *Scenedesmus obliquus* and the determination of its metabolic fate. *Bioresource Technology*, 205, 183-190. doi: 10.1016/j.biortech.2016.01.038
- Yu, J. T., Bouwer, E. J. & Coelhan, M. (2006). Occurrence and biodegradability studies of selected pharmaceuticals and personal care products in sewage effluent. *Agricultural Water Management*, 86(1-2), 72-80. doi: 10.1016/j.agwat.2006.06.015
- Zhang, D. Q., Tan, S. K., Gersberg, R. M., Sadreddini, S., Zhu, J. & Tuan, N. A. (2011). Removal of pharmaceutical compounds in tropical constructed wetlands. *Ecological Engineering*, 37(3), 460-464. doi: 10.1016/j.ecoleng.2010.11.002
- Zhou, G. J., Peng, F. Q., Zhang, L. J. & Ying, G. G. (2012). Biosorption of zinc and copper from aqueous solutions by two freshwater green microalgae *Chlorella pyrenoidosa* and *Scenedesmus obliquus*. *Environmental Science and Pollution Research*, 19(7), 2918-2929. doi: 10.1007/s11356-012-0800-9
- Zhou, G. J., Peng, F. Q., Zhang, L. J. & Ying, G. G. (2013). Cellular responses and bioremoval of nonylphenol and octylphenol in the freshwater green microalga *Scenedesmus obliquus*. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 87(1), 10-16. doi: 10.1016/j.ecoenv.2012.10.002
- Zorita, S., Martensson, L. & Mathiasson, L. (2009). Occurrence and removal of pharmaceuticals in a municipal sewage treatment system in the south of Sweden. *Science of the Total Environment*, 40(8), 2760-2770. doi: 10.1016/j.scitotenv.2008.12.030
- Zwiener, C. & Frimmel, F. (2000). Oxidative treatment of pharmaceuticals in water. *Water Research*, 34(6), 1881-1897.

## GLOSARIO

**Abiótico:** medio que carece de seres vivos.

**Bioacumulación:** proceso de acumulación de sustancias químicas en organismos vivos

**Biodegradación:** proceso natural en el que un material por acción biológica, cambia y en general pierde sus propiedades originales y a nivel químico las moléculas que lo conforma se convierten en formas más simples y estables.

**Biosíntesis:** proceso de múltiples pasos, catalizado por enzimas, en el que los sustratos se convierten en productos más complejos en los organismos vivos.

**Biosólidos:** residuos orgánicos sólidos, semisólidos o líquidos que resultan del tratamiento de las aguas residuales procesadas.

**Biotransformación:** proceso mediante el cual un organismo vivo modifica una sustancia química transformándola en otra diferente.

**Ciclooxigenasa:** enzima que permite al organismo producir unas sustancias llamadas prostaglandinas a partir del ácido araquidónico.

**Elastasa:** enzima encargada de la degradación de las fibras elásticas.

**Espectrofotometría:** método científico utilizado para medir cuánta luz absorbe una sustancia química, midiendo la intensidad de la luz cuando un haz luminoso pasa a través de la solución muestra, con base en la ley de Beer-Lambert.

**Eucariota:** célula que tiene el núcleo diferenciado mediante una membrana.

**Eutrofizante:** Materia que aporta enriquecimiento en compuestos de nitrógeno y fósforo para que las algas crezcan más rápidamente en aguas.

**Exógeno:** alude a aquello cuyo origen es externo (exterior).

**Extracelular:** se refiere a todo lo que está fuera de una célula.

**Ficoremediación:** conjunto de tecnologías que utilizan las microalgas para reducir, degradar o inmovilizar compuestos orgánicos contaminantes (naturales o sintéticos), de la tierra, del agua o del aire y que provienen de las actividades humanas.

**Fitotoxicidad:** término que se emplea para describir el grado de efecto tóxico producido por un compuesto sobre el crecimiento de las plantas.

**Fotocatálisis:** reacción fotoquímica que convierte la energía solar en energía química en la superficie de un catalizador o sustrato, consistente en un material semiconductor que acelera la velocidad de reacción.

**Fotoinhibición:** inhibición de la fotosíntesis causada por el exceso de radiación, afecta la producción en condiciones de campo, en gran medida.

**Fotólisis:** Descomposición química que, durante el proceso de fotosíntesis, sufre una molécula de agua debido a la acción de los rayos ultravioleta.

**Fotosistema:** centros donde se agrupan los pigmentos fotosintéticos, como la clorofila, entre otros.

**Hermafroditismo:** presencia normal en un ser vivo de órganos reproductivos funcionales de los dos sexos, masculino y femenino.

**Hidrofílico:** aquello que puede enlazarse temporalmente con el agua a través de un enlace hidrógeno.

**Hidrofobicidad:** ocurre cuando una molécula no es capaz de interactuar con las moléculas de agua ni por interacciones ión-dipolo ni mediante puentes de hidrógeno.

**Intracelular:** dentro de la célula.

**Lipofilicidad:** Afinidad por grasas y lípidos de alta solubilidad.

**Lixiviado:** líquido resultante de un proceso de percolación de un fluido a través de un sólido.

**Macronutriente:** nutrientes que suministran la mayor parte de la energía metabólica del cuerpo.

**Metabolito:** producto que queda después de la descomposición (metabolismo) de un fármaco por parte del cuerpo.

**Metabolizar:** asimilar y transformar el organismo una sustancia mediante cambios químicos y biológicos.

**Nanoestructura:** estructura con un tamaño intermedio entre las estructuras moleculares y microscópicas (de tamaño micrométrico).

**Prostaglandinas:** conjunto de sustancias de carácter lipídico derivadas de los ácidos grasos de 20 carbonos (eicosanoides), que contienen un anillo ciclopentano y

constituyen una familia de mediadores celulares, con efectos diversos, a menudo contrapuestos.

**Protonación:** adición de un protón ( $H^+$ ) a un átomo, molécula, o ion.

**Quelantes:** sustancia que forma complejos con iones de metales pesados.

**Sorción:** Interacción de un átomo, molécula o partícula con la superficie sólida de una interfaz sólido-líquido o una interfaz sólido-gas.

**Xenobiotico:** compuesto químico que no forme parte de la composición de los organismos vivos.