



**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE SAN
LUIS POTOSÍ**



FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS

**PROGRAMA DE POSGRADO EN
CIENCIAS QUÍMICAS**

**“EVALUACIÓN DE LA REMOCIÓN DE
FILTROS UV UTILIZANDO MICROALGAS”**

**TESIS PARA OBTENER EL GRADO DE
MAESTRA EN CIENCIAS QUÍMICAS**

**PRESENTA
LÓPEZ TORRES MARÍA ANDREA**

**DIRECTOR
DRA. RUTH ELENA SORIA GUERRA**

**CODIRECTOR
DR. OMAR GONZÁLEZ ORTEGA**

SAN LUIS POTOSÍ, S.L.P. MÉXICO

ENERO 2024

Proyecto realizado en el Laboratorio de Biotecnología Molecular de Células Vegetales y el Laboratorio de Bioseparaciones de la Facultad de Ciencias Químicas de la Universidad Autónoma de San Luis Potosí.

El programa de Maestría en Ciencias Químicas de la Universidad Autónoma de San Luis Potosí pertenece a la Categoría 1 del Sistema Nacional de Posgrados (SNP) del CONAHCyT, registro 000519, en el Nivel consolidado.

Número de registro de la beca otorgada por CONAHCyT: 812569

Número de CVU: 1180974



Evaluación de la remoción de filtros UV utilizando microalgas © 2024 by López Torres María Andrea is licensed under [Attribution-NonCommercial-ShareAlike 4.0 International](https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/4.0/)

Carta de Análisis de Similitud

San Luis Potosí SLP a 15 de enero de 2024

L.B. María Zita Acosta Nava
Biblioteca de Posgrado FCQ

Asunto: Reporte de porcentaje de similitud de tesis de grado

Por este medio me permito informarle el porcentaje de similitud obtenido mediante Ithenticate para la tesis titulada EVALUACIÓN DE LA REMOCIÓN DE FILTROS UV UTILIZANDO MICROALGAS presentada por el autor María Andrea López Torres. La tesis es requisito para obtener el grado de Maestría en el Posgrado en Ciencias Químicas. El análisis reveló un porcentaje de similitud de 13% excluyendo referencias y metodología.

Agradezco sinceramente su valioso tiempo y dedicación para llevar a cabo una exhaustiva revisión de la tesis. Quedo a su disposición para cualquier consulta o inquietud que pueda surgir en el proceso.

Sin más por el momento, le envío un cordial saludo.

A T E N T A M E N T E

Dra. Denisse Atenea de Loera Carrera
Coordinadora Académico del Posgrado
en Ciencias Químicas

San Luis Potosí, S.L.P.

18 de enero del 2024

**Comité Académico del Posgrado en Ciencias Químicas
Facultad de Ciencias Químicas de la UASLP.**

Presente.

Por medio de la presente comunicamos que la tesis llevada a cabo por la alumna de maestría IBP. María Andrea López Torres, titulada:

“Evaluación de la remoción de filtros UV utilizando microalgas”

Ha sido concluida y aprobada por el Comité Académico del Posgrado en Ciencias Químicas para dar inicio a los trámites correspondientes para su titulación. El examen de grado tendrá lugar el próximo 18 de enero del presente año a las 13:00 horas en la Sala de juntas del Posgrado de la Facultad de Ciencias Químicas de la UASLP.

Atentamente

Dra. Ruth Elena Soria Guerra
Directora de tesis

Dr. Omar González Ortega
Codirector de tesis

Dr. Alejandro Hernández Morales
Asesor de tesis



**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE SAN LUIS
POTOSÍ**

FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS



PROGRAMA DE POSGRADO EN CIENCIAS QUÍMICAS

**“EVALUACIÓN DE LA REMOCIÓN DE FILTROS UV UTILIZANDO
MICROALGAS”**

**TESIS PARA OBTENER EL GRADO DE
MAESTRA EN CIENCIAS QUÍMICAS**

PRESENTA:

MARÍA ANDREA LÓPEZ TORRES

Sinodales:

Dra. Ruth Elena Soria Guerra _____

Dr. Omar González Ortega _____

Dr. Alejandro Hernández Morales _____

AGRADECIMIENTOS

Al Consejo Nacional de Humanidades, Ciencia y Tecnología (CONAHCyT) por la beca otorgada durante los dos años de desarrollo de mi proyecto de maestría.

A la Dra. Ruth Elena Soria Guerra por permitirme ser parte de su equipo de investigación, por su apoyo y asesoría, por compartir su conocimiento y por sus detalles constantes a lo largo de la maestría. Siempre estaré agradecida y orgullosa de haber sido su alumna.

Al Dr. Omar González Ortega, por sus valiosas contribuciones para el desarrollo y culminación de este proyecto y para mi crecimiento personal, por sus consejos, apoyo, dirección, enseñanzas y paciencia.

Al Dr. Alejandro Hernández Morales, por su asesoría, consejos de mejora y por destinar tiempo en cada presentación y seminario.

Al Dr. Mariano de Jesús García Soto, por tomarse el tiempo de revisar mi proyecto aportando valiosas observaciones y consejos de mejora, por su disposición y apertura a la enseñanza.

A la Dra. Luzmila, que siempre está dispuesta a aconsejar, explicar y dar recomendaciones para mejorar.

A todos mis compañeros del laboratorio y posgrado, por los consejos en seminarios, preguntas enriquecedoras y apoyo.

DEDICATORIAS

A mi madre, por siempre estar presente, apoyándome, guiándome e impulsándome. Gracias por siempre ver el lado positivo y contagiarme tu amor a la vida, por siempre quererme y ayudarme a recuperar las fuerzas cuando sentí que ya no podía.

A mis hermanos, Mariana y Alejandro que se encargan de mostrarme lo grande que puede ser el mundo y ser un ejemplo de fuerza y valor. Por ser los mejores hermanos, hacerme reír y sentir amada en todo momento.

A mis tíos, porque siempre me han mostrado apoyo y amor, me han impulsado y demostrado que siempre puedo ser mejor.

A mis amigos Fer, Adry, Diego, Luis, Marijo y Anita que me han apoyado en cada momento importante desde hace más de una década. Gracias por siempre estar.

A mis amigos y compañeros de laboratorio, Abner, Jose Juan, Sarahí, Pablo, Julieta, Mariana, Saraí y Miguel, que se convirtieron en personas muy importantes en mi vida, gracias por brindarme su apoyo, amistad y por hacer de esta una etapa enriquecedora y divertida.

RESUMEN

Los filtros UV o solares son compuestos químicos de naturaleza orgánica e inorgánica utilizados ampliamente para evitar y/o reducir los efectos de la exposición a la radiación solar. Se encuentran presentes como aditivos en plásticos y pinturas o como componentes principales de los productos de cuidado personal. Actualmente los filtros UV, específicamente la oxibenzona y el homosalato, se pueden clasificar como contaminantes emergentes puesto que no existen normativas que regulen las concentraciones que los métodos de tratamiento convencionales liberan hacia los cuerpos de agua naturales como ríos, lagos, playas y océanos, lo cual culmina en el incremento de sus concentraciones que van desde los ng/L hasta $\mu\text{g/L}$. Además, se ha demostrado que ejercen efectos adversos en las especies acuáticas, por ejemplo: disrupción endócrina, disminución de la fertilidad y reproducción, mortalidad y una participación relevante en el blanqueamiento de corales.

Existen métodos de remoción alternativos como la ficorremediación, en la cual se hace uso de microalgas para la remoción de contaminantes. En este proyecto se evaluó la capacidad de remoción de oxibenzona y homosalato del agua a una concentración inicial de 5 mg/L, utilizando las microalgas *C. vulgaris* OW-01 y *S. acutus* UTEX-72. Para la oxibenzona, los resultados obtenidos muestran que el 0.96 % de remoción se obtuvo por adsorción y el 10.60 % por absorción, lo cual representa el 11.56 % de remoción utilizando *C. vulgaris*, además del 88.20 % de remoción por efecto de la fotodegradación. Por otra parte, del 23.95 % removido por *S. acutus*, el 1.06 % y el 22.89 % de remoción se obtuvieron por adsorción y absorción, respectivamente, mientras que el 76 % se atribuye a fotodegradación. El homosalato por su parte, no logró cuantificarse debido su posible fotodegradación o precipitación. En conclusión, las microalgas propuestas tienen la capacidad de remover filtros UV, especialmente oxibenzona, del agua y pueden utilizarse en sinergia con métodos como la fotodegradación para obtener mejores resultados.

Palabras clave: Contaminantes emergentes, Ficorremediación, Filtros UV, Fotodegradación, Homosalato, Oxibenzona.

ABSTRACT

UV filters are organic and inorganic chemical compounds widely used to avoid or reduce the effects of UV radiation exposure. They are present as additives in plastics and paints or as main components of personal care products. Currently, UV filters, specifically oxybenzone and homosalate, can be classified as emerging contaminants since there are no regulations that establish the concentrations released by conventional treatment methods into natural water bodies such as rivers, lakes, beaches, and oceans, which culminates in the increase of their concentrations from ng/L to µg/L. In addition, it has been shown that they exert adverse effects on aquatic species, for example: endocrine disruption, decreased fertility and reproduction, mortality and a relevant participation in coral bleaching. Removal methods, such as phycoremediation, in which microalgae are applied to remove contaminants can be used. In this project, the removal capacity of oxybenzone and homosalate from water at an initial concentration of 5 mg/L was evaluated, using the microalgae *C. vulgaris* OW-01 and *S. acutus* UTEX-72. For oxybenzone, the results obtained show that 0.96 % removal was obtained by adsorption and 10.60 % by absorption, which represents 11.56 % removal using *C. vulgaris*, in addition to 88.2 % oxybenzone removal due to photodegradation. On the other hand, of the 23.95 % removed by *S. acutus*, 1.06 % and 22.89 % removal were obtained by adsorption and absorption, respectively, while 76 % is attributed to photodegradation. Homosalate, for its part, could not be quantified due to its possible photodegradation or precipitation.

In conclusion, the proposed microalgae can remove UV filters, especially oxybenzone, from water and can be used in synergy with methods such as photodegradation to obtain better results.

Key words: Emerging contaminants, Homosalate, Oxybenzone, Phycoremediation, Photodegradation, UV Filters.

ÍNDICE

1.	INTRODUCCIÓN	1
1.1	CONTAMINANTES EMERGENTES	2
1.2	FILTROS UV	2
1.2.1	OXIBENZONA	3
1.2.2	HOMOSALATO	3
1.3	MECANISMOS DE DEGRADACIÓN	4
1.3.1	FOTODEGRADACIÓN.....	4
1.3.2	BIORREMEDIACIÓN MEDIANTE USO DE MICROALGAS	5
1.3.2.1	<i>Scenedesmus acutus</i>	6
1.3.2.2	<i>Chlorella vulgaris</i>	6
1.4	EFFECTOS EN EL MEDIO AMBIENTE	7
2.	ANTECEDENTES	9
3.	JUSTIFICACIÓN	12
4.	HIPÓTESIS	13
5.	OBJETIVO GENERAL	14
5.1	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	14
6.	METODOLOGÍA	15
6.1	CULTIVO DE MICROALGAS.....	15
6.2	PREPARACIÓN DE SOLUCIONES STOCK DE OXIBENZONA Y HOMOSALATO	16
6.3	DISEÑO EXPERIMENTAL.....	16
6.3.1	DETERMINACIÓN DEL MÉTODO DE SOLUBILIZACIÓN Y CONCENTRACIONES DE OXIBENZONA Y HOMOSALATO	16
6.3.2	EVALUACIÓN DEL EFECTO DE OXIBENZONA Y HOMOSALATO EN EL CRECIMIENTO DE MICROALGAS.....	17
6.3.3	CINÉTICAS DE CRECIMIENTO Y CUANTIFICACIÓN DE CLOROFILA A, OXIBENZONA Y HOMOSALATO.....	17
6.3.4	ANÁLISIS POR HPLC PARA EVALUAR LA REMOCIÓN DE OXIBENZONA Y HOMOSALATO	18
6.3.5	DETERMINACIÓN DEL MECANISMO DE REMOCIÓN.....	18
6.3.5.1	DESORCIÓN DE LA PARED CELULAR.....	19
6.4	MODELADO DE DATOS Y ANÁLISIS ESTADÍSTICO	19
7.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	22
7.1	DETERMINACIÓN DEL MÉTODO DE CUANTIFICACIÓN DE OXIBENZONA Y HOMOSALATO MEDIANTE HPLC.....	22

7.2 DETERMINACIÓN DEL MÉTODO DE SOLUBILIZACIÓN DE OXIBENZONA Y HOMOSALATO.....	22
7.3 DETERMINACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN DE OXIBENZONA Y HOMOSALATO	29
7.4 CUANTIFICACIÓN DE CLOROFILA.....	37
7.5 ANÁLISIS POR HPLC PARA EVALUAR LA REMOCIÓN DE OXIBENZONA Y HOMOSALATO	38
7.6 DESORCIÓN DE LA PARED CELULAR	45
8. CONCLUSIONES	48
9. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	50
10. ANEXOS	53
11. GLOSARIO	58

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Estructura de los filtros solares	4
Figura 2. <i>Scenedesmus acutus</i>	6
Figura 3. <i>Chlorella vulgaris</i>	7
Figura 4. Efecto de diferentes concentraciones de etanol en <i>C. vulgaris</i> y <i>S. acutus</i> en medio Bold basal.	25
Figura 5. Efecto del Tween 20 en <i>C. vulgaris</i> y <i>S. acutus</i> en medio Bold basal ...	28
Figura 6. Crecimiento de <i>C. vulgaris</i> y <i>S. acutus</i> en presencia de Tween 20 0.1 %	27
Figura 7. Efecto de diferentes concentraciones de oxibenzona y homosalato en el crecimiento de <i>C. vulgaris</i> y <i>S. acutus</i> en medio Bold basal.	31
Figura 8. Efecto de 1, 5 y 10 mg/L de oxibenzona y homosalato en el crecimiento de <i>C. vulgaris</i> en medio Bold basal	34
Figura 9. Efecto de 5 y 10 mg/L de oxibenzona en el crecimiento de <i>S. acutus</i> en medio TAP.....	35
Figura 10. Cuantificación de clorofila a de <i>C. vulgaris</i> y <i>S. acutus</i> en presencia de 5 mg/L de oxibenzona	38
Figura 11. Recta de calibración estándar de oxibenzona.	39
Figura 12. % de remoción de oxibenzona por <i>C. vulgaris</i> en medio Bold basal...	41
Figura 13. % de remoción de 5 y 10 mg/L de oxibenzona por <i>S. acutus</i> en medio TAP	42
Figura 14. % de remoción de 5 mg/L de oxibenzona a las 96 h por <i>S. acutus</i> en medio TAP.....	44
Figura 15. % de remoción de oxibenzona por <i>C. vulgaris</i> en medio TAP.....	45

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Promedio de la concentración de oxibenzona y homosalato en diferentes matrices.....	10
Tabla 2. Composición de 1 L de medio nutritivo Bold basal líquido:	15
Tabla 3: Composición del medio nutritivo TAP líquido:.....	16
Tabla 4. Parámetros cinéticos de <i>C. vulgaris</i> y <i>S. acutus</i> expuestas a diferentes concentraciones de etanol en medio Bold basal.	24
Tabla 5. Parámetros cinéticos de <i>C. vulgaris</i> y <i>S. acutus</i> expuestas a diferentes concentraciones de Tween 20 en medio Bold basal.	27
Tabla 6. Parámetros cinéticos de <i>C. vulgaris</i> expuestas a diferentes concentraciones de oxibenzona en medio Bold basal.....	30
Tabla 7. Parámetros cinéticos de <i>S. acutus</i> expuestas a diferentes concentraciones de oxibenzona en medio Bold basal.....	30
Tabla 8. Parámetros cinéticos de <i>C. vulgaris</i> expuestas a diferentes concentraciones de homosalato en medio Bold basal.	30
Tabla 9. Parámetros cinéticos de <i>S. acutus</i> expuestas a diferentes concentraciones de homosalato en medio Bold basal.	31
Tabla 10. Parámetros cinéticos de <i>C. vulgaris</i> expuestas a concentraciones de 1, 5 y 10 mg/L de oxibenzona en medio Bold basal.	33
Tabla 11. Parámetros cinéticos de <i>C. vulgaris</i> expuestas a concentraciones de 1, 5 y 10 mg/L de homosalato en medio Bold basal.....	33
Tabla 12. Parámetros cinéticos de <i>S. acutus</i> expuestas a concentraciones de 5 y 10 mg/L de oxibenzona en medio TAP.	36
Tabla 13. Análisis de remoción de oxibenzona de <i>C. vulgaris</i> y <i>S. acutus</i> utilizando medio TAP.....	46

1. INTRODUCCIÓN

En la actualidad los efectos de la radiación solar (envejecimiento prematuro, quemaduras y cáncer de piel) en la salud del ser humano han llegado a considerarse un problema de salud pública. Para contrarrestar estos efectos se crearon los filtros solares o UV, los cuales, dependiendo de su mecanismo de acción, pueden ser de naturaleza orgánica o inorgánica (Ramos, Homem, Alves, & Santos, 2015). Los filtros solares son utilizados en productos de cuidado personal (bloqueadores solares, lociones, cremas y maquillaje, entre otros), así como aditivos en plásticos, adhesivos y pinturas para protegerlos de la degradación y desgaste ocasionado por la radiación UV. Debido a su uso constante se han encontrado en aguas residuales y a su vez en cuerpos de agua naturales como ríos, lagos y playas lo que provoca su contaminación y afecta de manera negativa a las especies que ahí habitan (Mitchelmore, et al., 2019).

Algunos de los principales efectos negativos encontrados en organismos acuáticos son: hermafroditismo, toxicidad, inhibición del crecimiento y disrupción endócrina (Walton, 2018); sin embargo, estos efectos han comenzado a ser notorios hace apenas algunos años, por lo que se les considera contaminantes emergentes, es decir, contaminantes cuyas repercusiones y/o afectaciones aún son completa o parcialmente desconocidas (Fent, Zenker, Rapp, & Kunz, 2010).

La reciente presencia y acumulación de estos contaminantes genera una serie de implicaciones como desconocimiento de sus efectos, requerimiento de inversión de fondos para investigación, una inadecuada regulación gubernamental y que las plantas de tratamiento convencionales no se encuentren debidamente equipadas para su cuantificación y eliminación (Pacheco, Rocha, Pereira, & Verdelhos, 2020).

Los motivos antes expuestos reflejan la necesidad de encontrar soluciones para su remoción. En este proyecto se realizó la evaluación de la remoción de filtros UV utilizando las microalgas *Chlorella vulgaris* y *Scenedesmus acutus*, las cuales resultan de interés debido a su capacidad de remoción de contaminantes orgánicos y posible reutilización (Matamoros, Gutiérrez, Ferrer, García, & Bayona, 2015).

1.1 CONTAMINANTES EMERGENTES

La Agencia de Protección Ambiental (EPA por sus siglas en inglés) de los Estados Unidos define a los contaminantes emergentes como nuevos productos químicos no regulados y cuyo impacto es desconocido (Khan, et al., 2020). También pueden definirse como todo aquel compuesto de origen y naturaleza variable con una concentración no significativa en el medio ambiente por lo que sus efectos difícilmente pueden ser detectados (Gil, Soto, Usma, & Gutiérrez, 2012). En México, el Instituto Mexicano de Tecnología del Agua los define como todo aquel contaminante previamente desconocido o no reconocido como tal, cuya presencia no es necesariamente nueva, pero si la preocupación por las posibles consecuencias de esta.

Entre los contaminantes emergentes se encuentran fármacos, compuestos perfluorados, hormonas, drogas de abuso y productos de cuidado e higiene personal (Instituto Mexicano de Tecnología del Agua, 2018).

1.2 FILTROS UV

En los últimos años la fotoprotección se ha convertido en una necesidad para evitar los daños ocasionados por la radiación UVA y UVB. Actualmente existe una gran variedad de productos de cuidado personal que contienen filtros UV como oxibenzona, homosalato, avobenzona, octocrileno y octinoxato, entre otros (Schneider & Lim, 2019).

Los filtros UV también conocidos como filtros solares, pueden clasificarse en dos tipos: inorgánicos (tales como el óxido de zinc y dióxido de titanio), los cuales reflejan y dispersan los rayos UV; y orgánicos (entre los que se encuentran benzofenona, homosalato, octocrileno, avobenzona y oxibenzona) que convierten la luz solar en calor a una longitud de onda inofensiva para la piel (Walton, 2018). Suelen utilizarse en conjunto, llegando a acumular 20 o más componentes en un solo producto (Rodríguez, González, Diéguez, & Flores, 2022). Cada clasificación tiene diferentes características, por ejemplo, los filtros inorgánicos se encuentran de

manera natural en el medio ambiente acuático y algunos estudios han demostrado que estos componentes no penetran la piel, por lo cual no representan un riesgo para la salud del ser humano (Ouchene, Litvinov, & Netchiporouk, 2019). Por su parte, los filtros UV orgánicos han mostrado una gran lipofilicidad, lo cual genera mayor toxicidad puesto que los organismos son capaces de bioacumularlos. Esto puede causar efectos en la actividad hormonal y estrogénica de los peces (Fent, Zenker, Rapp, & Kunz, 2010), así como en el comportamiento reproductivo de diferentes especies marinas como la trucha arcoíris, peces blancos, bacalao, barbo, cacho y mejillones (Ouchene, Litvinov, & Netchiporouk, 2019).

1.2.1 OXIBENZONA

La oxibenzona, también conocida como benzofenona-3, es un compuesto orgánico altamente hidrofóbico utilizado como fármaco dermatológico y agente protector de radiación UV que ha mostrado tener efecto xenobiótico y ser contaminante ambiental (National Center for Biotechnology Information, 2024).

Es una molécula conjugada capaz de absorber luz a bajas energías, en comparación con otras moléculas de igual clasificación, es ampliamente usada para la protección solar en plásticos y productos cosméticos y de cuidado personal, además de ser fotoestabilizador en resinas sintéticas (Lee, et al., 2020). En los filtros solares proporciona protección ante radiación UVA y UVB ya que posee un perfil de absorción de 270 a 350 nm con picos de absorción de 288 y 350 nm (Arellano, et al., 2014).

1.2.2 HOMOSALATO

El homosalato es un compuesto orgánico de alta hidrofobicidad que pertenece a los salicilatos, formado a partir del ácido salicílico y el 3,3,5-trimetilciclohexanol. Es un absorbente de la luz UVB principalmente, por lo que se usa en productos cosméticos para evitar la exposición directa de la piel a los rayos nocivos del sol (National Center

for Biotechnology Information, 2024). Su rango de absorción se encuentra alrededor de los 300 nm (290-315 nm) (Arellano, et al., 2014).

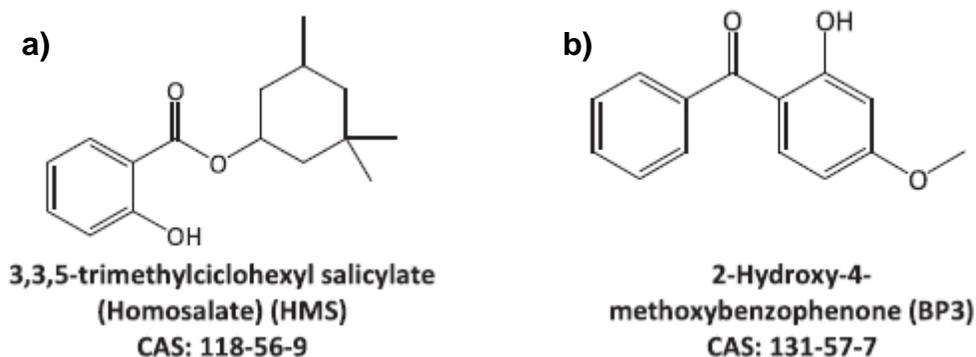


Figura 1. Estructura de los filtros solares: Se muestra la estructura de los filtros solares a) homosalato y b) oxibenzona (Ramos, Homem, Alves, & Santos, 2015)

1.3 MECANISMOS DE DEGRADACIÓN

Una vez que las sustancias o elementos son liberados al medio ambiente, usualmente se convierten en contaminantes, cuya acumulación puede ocasionar efectos adversos para los organismos que entran en contacto con ellas (Gil, Soto, Usma, & Gutiérrez, 2012).

Existen diferentes métodos de degradación que pueden clasificarse en físicos (sedimentación, volatilización, dispersión, deposición, etc.), químicos (hidrólisis, fotólisis, sorción) y biológicos (biodegradación, bioacumulación, biotransformación). Entre ellos, es posible generar sinergias, puesto que las deficiencias de un método pueden ser complementadas con otro, por ejemplo, algunos de los productos generados por fotodegradación podrían ser tratados mediante biorremediación (Jha, et al., 2023).

1.3.1 FOTODEGRADACIÓN

La fotodegradación puede definirse como una reacción química producida por efecto de la luz para descomponer un compuesto o molécula en moléculas de menor tamaño, la cual puede ser inducida por radiación infrarroja (IR), ultravioleta (UV) o

visible (VIS) y que puede llevarse a cabo tanto en la atmósfera, como en el agua o el suelo. Es de gran importancia en el proceso de remediación ya que permite la degradación y/o descomposición de contaminantes (Sánchez Prado, 2007).

En aguas naturales la fotodegradación juega un papel importante y complejo ya que depende de una variedad de factores como son la estructura química del contaminante, la concentración de fotones a los que el compuesto tiene acceso (es decir, qué tan superficialmente se encuentra) y la energía absorbida. Esta última debe ser suficiente para romper o reordenar enlaces, o en su defecto generar alguna reacción de reducción-oxidación. Siempre existe la posibilidad de generar intermediarios que, dependiendo de su naturaleza, podrían ser incluso más contaminantes (Fraga Dominguez, 2012).

1.3.2 BIORREMEDIACIÓN MEDIANTE USO DE MICROALGAS

El crecimiento de la población sin precedentes, así como la urbanización e industrialización han generado el incremento de contaminantes emergentes, como los filtros UV, presentes en el agua; ello implica que las plantas de tratamiento de aguas residuales no tengan una referencia respecto a las concentraciones consideradas seguras o con un bajo cociente de riesgo para la descarga, además, hacen uso de procesos físicos y químicos que han demostrado ser ineficientes ya que no se encuentran equipadas o acondicionadas para eliminar contaminantes emergentes (Pacheco, Rocha, Pereira, & Verdelhos, 2020).

Los sistemas basados en microalgas, también conocidos como ficorremediación, han tomado interés y se consideran una alternativa para el tratamiento terciario de las plantas de aguas residuales debido a su capacidad de remoción y biodegradación de contaminantes, fármacos y metales, entre otros (Sousa, Sousa, Vale, & Simoes, 2021), además de que la biomasa puede ser reutilizada como fertilizante o en la producción de biocombustibles contribuyendo a una economía circular (Pacheco, Rocha, Pereira, & Verdelhos, 2020).

Entre la gran cantidad de especies de algas existentes, *Scenedesmus acutus* y *Chlorella vulgaris* son de interés debido a que poseen la capacidad de resistencia y

fácil adaptación a variaciones en el medio ambiente, además de soportar elevadas concentraciones de nutrientes provenientes de aguas residuales y tener gran capacidad metabólica (Andrade, Vera, Cárdenas, & Morales, 2009).

1.3.2.1 *Scenedesmus acutus*

El género *Scenedesmus* puede encontrarse comúnmente en aguas residuales y aguas dulces. Son algas verdes de reproducción asexual que suelen formar cenobios de entre 2 y 16 células (Nanduca, 2015).

La especie tiene un rango de tolerancia a cambios de temperatura de -3 °C a 28 °C, siendo fotosintéticamente activa a -8 °C, en cuanto a pH tolera un rango de 5.5 a 8 siendo 6.8 el óptimo para su crecimiento (Sánchez, 2021). Posee la capacidad de resistir elevadas concentraciones de nutrientes presentes en aguas residuales, tiene gran capacidad metabólica y tolerancia a variaciones ambientales (Andrade, Vera, Cárdenas, & Morales, 2009).

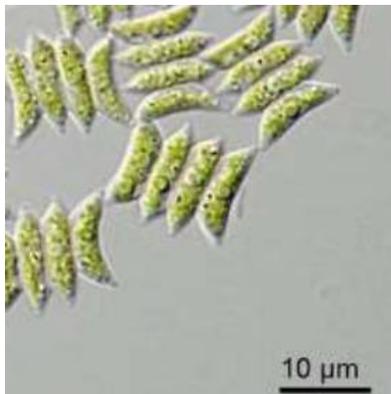


Figura 2. *Scenedesmus acutus* (Sánchez, 2021).

1.3.2.2 *Chlorella vulgaris*

Chlorella vulgaris posee un rápido crecimiento en condiciones autotróficas, mixotróficas y heterotróficas, por lo cual es ampliamente usada en el sector comercial (Gómez , Tormos, & Ortega, 2022). El género incluye algas verdes con

una alta concentración de clorofila a y b, lo que le confiere una gran capacidad fotosintética en comparación con otras algas, permitiéndole carecer de un aporte exógeno de materia orgánica. Puede crecer en aguas marinas, dulces y residuales; y posee una gran capacidad de absorción de contaminantes (Sánchez, 2021).

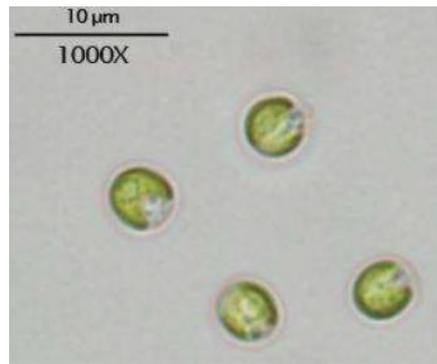


Figura 3. *Chlorella vulgaris* (Sánchez, 2021).

1.4 EFECTOS EN EL MEDIO AMBIENTE

La reciente popularización de productos que contienen filtros UV ha generado el aumento de su concentración en cuerpos de agua como mares, océanos, ríos, lagos y arroyos; sobre todo en verano cuando la concentración de personas en contacto con ellos es mayor (Walton, 2018). Actualmente, en la mayoría de los casos, se encuentran en concentraciones de ng/L hasta μg/L (Walton, 2018); sin embargo, su concentración sigue en aumento debido a la poca capacidad de remoción de las plantas de tratamiento convencionales (Sandoval, Morales-Granados, & Rubio, 2020). Según lo reportado, existen dos fuentes principales de contaminación: indirectas (descargas de aguas residuales urbanas e industriales) y directas (actividades turísticas o recreativas) (Fent, Zenker, Rapp, & Kunz, 2010).

Al ser considerados contaminantes emergentes, no existen aún regulaciones respecto a las concentraciones de descarga permitidas de estos compuestos; por tanto, se genera una disminución en la calidad del agua que impacta negativamente a los ecosistemas, la salud pública y el crecimiento económico (Pacheco, Rocha, Pereira, & Verdelhos, 2020).

Sus efectos adversos comenzaron a conocerse hasta hace unos 5 o 7 años en suelos y cuerpos de agua naturales, ocasionando efectos negativos a los organismos acuáticos (principalmente peces y afectando las cadenas tróficas), el blanqueamiento de corales y llegando incluso al ser humano mediante su ingesta alimenticia (Rodríguez, González, Diéguez, & Flores, 2022).

2. ANTECEDENTES

Desde la antigüedad el ser humano ha buscado la manera de protegerse de los efectos del sol mediante el uso de barreras físicas. Tal es el caso de esclavos egipcios y romanos que, ante la exposición a prolongados periodos bajo el sol, terminaban con graves quemaduras en la piel, por lo cual usaban túnicas y recubrimientos de tela.

Durante la segunda guerra mundial, el farmacéutico Benjamín Green creó la primera sustancia con el propósito de proteger a los soldados, cuyas misiones implicaban largos tiempos de espera, muchas veces inmovilizados, en condiciones de exposición a la luz solar. Para ello utilizó una parafina viscosa que se colocaba en cantidades suficientes para crear una barrera (Molina, 2018).

Más tarde, en el año de 1946, el químico Franz Greiter creó el primer protector solar contra los efectos de la radiación UV para su venta al público, siendo hasta los años 90 cuando comenzaron a aparecer filtros solares con la capacidad de brindar protección frente a rayos UVA y UVB; sin embargo, sin legislación alguna que los regulase (Molina, 2018).

El porcentaje máximo de componentes individuales contra la radiación ultravioleta UV que puede contener un producto de cuidado personal varía según el país. En el Reino Unido un protector solar puede contener hasta el 10 % de oxibenzona, mientras que en los Estados Unidos de América se permite un máximo del 6 % y 15 % de oxibenzona y homosalato, respectivamente, en comparación con el total de los componentes del producto (Mitchelmore, et al., 2019).

Actualmente ha surgido la necesidad de evaluar los efectos tóxicos de la acumulación de compuestos incluidos en productos de higiene y cuidado personal, como los filtros solares. Taylor, en su trabajo publicado en 2018, determinó las concentraciones de toxicidad de tres filtros UV: oxibenzona, homosalato y atrazina, siendo el homosalato el de mayor toxicidad y el que ocasiona mayor reducción del crecimiento de *S. acutus*, mientras que la oxibenzona mostró el menor efecto de toxicidad, pero la mayor concentración encontrada (Walton, 2018).

En la Tabla 1 se muestran las concentraciones de homosalato y oxibenzona reportadas en ríos, playas y agua de grifo de diferentes sitios de muestreo.

Tabla 1. Promedio de la concentración de oxibenzona y homosalato en diferentes matrices (*Ramos, Homem, Alves, & Santos, 2015*):

Matriz	Promedio de la concentración de oxibenzona (mg/L)	Promedio de la concentración de homosalato (mg/L)
Agua de río	3.5756×10^{-3}	1.654×10^{-4}
Agua de mar	2.6154×10^{-3}	6.079×10^{-4}
Agua de lagos	7.72×10^{-5}	n.d.
Aguas subterráneas	2.095×10^{-5}	n.d.
Agua de grifo	4.50×10^{-4}	5.15×10^{-4}
Agua de alberca	2.1229×10^{-3}	n.d.
Promedio total	1.4770×10^{-3}	4.294×10^{-4}

*n.d.: No detectado.

Como medidas contra la contaminación de agua ocasionada por actividades recreativas en zonas costeras, se ha reportado la implementación de algunas restricciones, por ejemplo: la prohibición de la venta de protectores solares que contienen oxibenzona y octinoxato en Hawái y Florida, la aprobación de una ley en contra de la venta de bloqueador solar con oxibenzona, octocrileno y octinoxato en Palau (Oceanía) o el intercambio con los turistas de protectores solares no biodegradables por otros capaces de biodegradarse en un parque acuático de México, con el cual se han logrado intercambiar más de 10,000 productos al año (Ouchene, Litvinov, & Netchiporouk, 2019). No obstante, estas medidas siguen siendo mínimas y no representan una solución real del problema.

Tratamientos como la biorremediación mediante el uso de microalgas constituyen una opción para la eliminación de filtros solares del agua. En 2009, Andrade y colaboradores reportaron una eficiencia de *Scenedesmus sp.* en la remoción de nitrógeno, fosfatos y materia orgánica, proveniente de aguas residuales de pescadería, del 100 %, 78 % y 36 %, respectivamente; además de un alto contenido proteico, grasas y sales minerales en biomasa seca para su implementación en alimento para animales.

Un estudio similar realizado por Solís Martínez en 2018 demostró la capacidad de *Chlorella vulgaris* para remover de aguas residuales hasta el 95 % de nitrógeno, 75 % de fosfatos, 11 % de plomo y 93 % de níquel; además de la reducción de la carga bacteriana (Solís, 2018). En cuanto a la remoción de filtros UV, Lee y colaboradores, en 2020, reportaron una eficiencia de remoción del 23 al 29 % cuando la microalga *Scenedesmus obliquus* fue expuesta a concentraciones de 0.1 y 3 mg/L de oxibenzona, respectivamente (Lee, et al., 2020).

3. JUSTIFICACIÓN

El amplio uso de los filtros UV en los productos de cuidado personal y su presencia en los cuerpos de agua son una importante amenaza para los ecosistemas. Su presencia ha sido detectada en sistemas naturales de gran relevancia ecológica y económica como los estuarios de Chesapeake, las costas de las islas del Mar Caribe, el Mar Mediterráneo, el Océano Pacífico, el Océano Atlántico y en Hawái, donde se han detectado hasta 14,000 toneladas al año, repercutiendo en el blanqueamiento de los corales marinos (Ouchene, Litvinov, & Netchiporouk, 2019), afectando la salud de los organismos acuáticos y ocasionando un impacto en las actividades económicas del ser humano. Entre los efectos de la presencia de filtros UV en el agua, reportados en peces y otros organismos acuáticos, se encuentran: la disrupción endócrina, cambios en el comportamiento, reducción de tamaño y efectos en la fecundidad y en la fertilidad (Fent, Zenker, Rapp, & Kunz, 2010). Un estudio realizado en 2020 por Fitt y Hoffman para evaluar los efectos de la oxibenzona demostró que afecta la motilidad y aumenta la mortalidad en medusas (Fitt & Hoffmann, 2020). Por su parte, Layton en 2015 demostró que el homosalato y la oxibenzona presentaron efectos de disrupción endócrina en *Daphnia magna* (Layton, 2015).

Al ser contaminantes emergentes, en la actualidad no existen normas ni regulaciones para las concentraciones máximas permitidas de filtros UV en el agua, además, los elevados costos implicados en su detección y eliminación generan que las plantas de tratamiento de aguas residuales los descarguen en lagos, ríos, acuíferos y aguas costeras; ocasionando que estos contaminantes lleguen a los cuerpos de agua naturales, afectando a las especies acuáticas (Pacheco, Rocha, Pereira, & Verdelhos, 2020) y generando su retorno al ser humano a través del agua que se consume. Algunos estudios sugieren que las tecnologías basadas en la remoción de contaminantes mediante el uso de microalgas podrían eliminarlos mediante procesos bióticos (metabolización, biodegradación o absorción) o abióticos (volatilización, fotodegradación o sorción) (Matamoros, Gutiérrez, Ferrer, García, & Bayona, 2015).

4. HIPÓTESIS

El cultivo de las microalgas *S. acutus* y *C. vulgaris* permite reducir la concentración o remover totalmente los filtros UV oxibenzona y homosalato *in vitro* mientras que la comparación entre ambas especies posibilita determinar si alguna es más eficiente para ser seleccionada como propuesta para el tratamiento de aguas residuales.

5. OBJETIVO GENERAL

Determinar la capacidad de remoción de dos filtros UV (oxibenzona y homosalato) por las microalgas *Scenedesmus acutus* y *Chlorella vulgaris*.

5.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Desarrollar métodos de cuantificación de oxibenzona y homosalato utilizando cromatografía de líquidos de alta resolución con detector de absorbancia y/o fluorescencia.
- Obtener la cinética de crecimiento de las microalgas en presencia y ausencia de los filtros UV.
- Establecer la concentración de oxibenzona y homosalato que permite el crecimiento de *S. acutus* y *C. vulgaris*.
- Determinar la concentración de clorofila en los cultivos de las microalgas expuestas a los filtros UV.
- Cuantificar la concentración de oxibenzona y homosalato en el medio de cultivo durante la cinética de crecimiento.
- Evaluar la cantidad de oxibenzona y homosalato desorbido de la pared celular de las microalgas al finalizar la cinética de crecimiento.

6. METODOLOGÍA

6.1 CULTIVO DE MICROALGAS

Para realizar este proyecto se utilizaron cultivos de *S. acutus* UTEX-72 y *C. vulgaris* OW-01, proporcionadas por la Universidad Autónoma de Aguascalientes. La propagación se llevó a cabo en medio nutritivo Bold basal y medio TAP líquidos (cuya composición para la preparación de 1 L de medio se indica en las Tablas 2 y 3, respectivamente) a una temperatura de 25 °C con fotoperiodos de 16 h de luz blanca y 8 h de oscuridad, en presencia de Tween 20 a una concentración de 0.1 %, con la finalidad de mejorar la solubilidad de los filtros solares oxibenzona y homosalato.

Para mantener un stock celular se llevaron a cabo resiembras por estría en medio Basal Bold con agar al 1.5 % y se almacenaron en las mismas condiciones de luz y temperatura

Tabla 2. Composición de 1 L de medio nutritivo Bold basal líquido:

Reactivo	Cantidad (mg)	Reactivo	Cantidad (mg)
NaNO ₃	250	MnCl ₂ -4H ₂ O	1.44
MgSO ₄ - 7 H ₂ O	75	MoO ₃	0.71
NaCl	25	CuSO ₄ - 5H ₂ O	1.57
K ₂ HPO ₄	75	Co(NO ₃) ₂ -6H ₂ O	0.49
KH ₂ PO ₄	175	H ₃ BO ₃	11.42
CaCl - 2H ₂ O	25	EDTA	50
ZnSO ₄ - 7 H ₂ O	8.82	KOH	31
FeSO ₄ -7H ₂ O	4.98		

Tabla 3: Composición del medio nutritivo TAP líquido:

Reactivo	Cantidad (mg)	Reactivo	Cantidad (mg)
Tris Base	2420	ZnSO ₄ - 7 H ₂ O	44
NH ₄ Cl	375	H ₃ BO ₃	23
MgSO ₄ -7H ₂ O	100	MnCl ₂ -4H ₂ O	10
CaCl ₂ -2H ₂ O	50	CoCl ₂ -6H ₂ O	3
K ₂ HPO ₄	10	(NH ₄) ₆ Mo ₇ O ₂₄ -4H ₂ O	3
KH ₂ PO ₄	5	CuSO ₄ - 5H ₂ O	2.2
EDTA	127	FeSO ₄ -7H ₂ O	10

6.2 PREPARACIÓN DE SOLUCIONES STOCK DE OXIBENZONA Y HOMOSALATO

Debido a su hidrofobicidad, la oxibenzona y el homosalato fueron disueltos previamente en etanol grado absoluto a una concentración de 1000 mg/L. Posteriormente se realizaron las diluciones pertinentes para alcanzar la concentración a utilizar en los cultivos de *C. vulgaris* y *S. acutus*. Para conservar los stocks se almacenaron a una temperatura de 4 °C en condiciones de oscuridad.

6.3 DISEÑO EXPERIMENTAL

6.3.1 DETERMINACIÓN DEL MÉTODO DE SOLUBILIZACIÓN Y CONCENTRACIONES DE OXIBENZONA Y HOMOSALATO

Como se mencionó con anterioridad al describir las características de la oxibenzona y del homosalato, se trata de compuestos altamente hidrofóbicos que requieren ser solubilizados previo a la evaluación de su posible remoción con microalgas, para ello fue necesario determinar qué tipo de solvente es posible utilizar sin que resulte tóxico para las microalgas, por lo cual se propusieron mezclas acuosas con DMSO al 10 %, etanol al 30, 15, 5 y 1 % y Tween 20 en 0.5 y 0.1 %.

Una vez seleccionado el solvente, se procedió a evaluar la toxicidad de diferentes concentraciones de los filtros oxibenzona y homosalato en el crecimiento

de las microalgas para, posteriormente, seleccionar aquella concentración que no refleje toxicidad.

6.3.2 EVALUACIÓN DEL EFECTO DE OXIBENZONA Y HOMOSALATO EN EL CRECIMIENTO DE MICROALGAS

Se generaron inóculos adicionados con concentraciones de 10, 5 y 1 mg/L de oxibenzona y homosalato, así como un control biológico (sin oxibenzona y homosalato) y un control químico sin inocular (medio Bold basal y filtros UV sin biomasa), para determinar la máxima concentración a la que los mencionados filtros UV no presentan toxicidad, así como verificar si existe fotodegradación. Posteriormente se incubaron a 25 °C con aireación continua y fotoperiodos de 16 h de luz y 8 h de oscuridad hasta alcanzar la fase estacionaria. Se tomaron alícuotas de 1 mL de los cultivos cada 24 h para determinar la OD_{750nm} hasta llegar a fase estacionaria y se comparó el crecimiento de las microalgas expuestas a los filtros UV con el control biológico. Cada prueba se realizó por triplicado.

6.3.3 CINÉTICAS DE CRECIMIENTO Y CUANTIFICACIÓN DE CLOROFILA A, OXIBENZONA Y HOMOSALATO

Se montaron inóculos de *C. vulgaris* y *S. acutus* en medio basal Bold con las concentraciones de oxibenzona y homosalato definidas en la sección 6.3.2, partiendo de una OD_{750nm} = 0.1 para asegurar que las microalgas se encuentren en fase exponencial. Posteriormente se extrajeron 2 mL de muestra de cada matraz cada 24 h hasta que los cultivos alcanzaron la fase estacionaria, se determinó la OD_{750nm} haciendo uso del equipo Glomax y se obtuvieron las curvas de crecimiento. El volumen restante se utilizó para la determinación de *clorofila a* y para la cuantificación de oxibenzona y homosalato en el medio de cultivo.

Para la cuantificación de *clorofila a* se tomó 1 mL de la muestra, se centrifugó a 10 000 rpm durante 5 min y se retiró y almacenó el sobrenadante. Posteriormente se realizó un lavado con 1 mL de agua destilada y se centrifugó nuevamente bajo

las mismas condiciones descartando el sobrenadante; al pellet se le añadió 1 mL de metanol absoluto. Se procedió a calentar hasta 60 °C durante 13 min y se incubó durante 24 h a 4 °C en condiciones de oscuridad para favorecer la liberación de clorofila. Una vez concluido el tiempo de incubación, se centrifugó nuevamente para obtener el sobrenadante. Utilizando un espectrofotómetro, se midió la absorbancia contra un blanco de metanol absoluto y se procedió a realizar el cálculo de la concentración de clorofila empleando la Ecuación 1 (Arredondo Vega, Voltolina, Zenteno Savín, Arce Montoya, & Gómez Anduro, 2017).

$$\text{Clorofila } a \left(\frac{\mu\text{g}}{\text{mL}} \right) = 16.72_{A_{665}} - 9.16_{A_{652}} \dots \text{Ec. 1}$$

Cada ensayo fue realizado por triplicado para asegurar la confiabilidad y reproducibilidad de los resultados.

6.3.4 ANÁLISIS POR HPLC PARA EVALUAR LA REMOCIÓN DE OXIBENZONA Y HOMOSALATO

Para determinar si existe disminución de la concentración de filtros UV del medio de cultivo durante la cinética de crecimiento, las muestras se analizaron por cromatografía líquida de alta resolución (HPLC por sus siglas en inglés) utilizando un equipo Agilent 1260 Infinity y una columna empacada con sílice C-18 esférica Eclipse XDB-C18, 5 µM, 4.6 × 150 mm marca Agilent debido a que brinda resultados precisos y es altamente sensible a pequeñas variaciones. De igual manera cada ensayo se realizó por triplicado para una mayor confiabilidad.

6.3.5 DETERMINACIÓN DEL MECANISMO DE REMOCIÓN

Las microalgas llevan a cabo distintos métodos de remoción. De acuerdo con la naturaleza del compuesto, este puede ser adsorbido en la pared celular o transportado al interior de la célula para su biotransformación o bioacumulación. Por ello, se realizó un análisis de desorción, lo cual permitió suponer que el restante de

la remoción atribuida a la presencia de las microalgas se realizó mediante absorción por alguno de los métodos ya mencionados. Por otro lado, en cada experimento se colocaron controles químicos sin biomasa para evaluar la remoción por métodos abióticos como la fotólisis.

Una vez obtenida esta información, es posible determinar una ecuación (Ec 2) que permita relacionar los factores que contribuyen a la remoción de oxibenzona, tanto bióticos como abióticos.

$$R_T = R_D + R_A + R_F \dots\dots\dots \text{Ec. 2}$$

Dónde:

R_T – Remoción total

R_D – Remoción por adsorción

R_A – Remoción por absorción

R_F – Remoción por fotólisis

6.3.5.1 DESORCIÓN DE LA PARED CELULAR

Al finalizar las cinéticas previamente indicadas, se tomó una muestra de cada cultivo y se realizó el secado de la biomasa, así como el registro del peso seco obtenido. Debido a que es posible que las microalgas puedan llevar a cabo procesos de remoción por bioadsorción en la pared celular, se realizaron lavados con un etanol grado reactivo para remover cualquier cantidad de filtro UV que pueda encontrarse adsorbido a esta. El sobrenadante obtenido se resuspendió en etanol absoluto y se analizó mediante la técnica de HPLC previamente descrita. El análisis se realizó por triplicado.

6.4 MODELADO DE DATOS Y ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Para realizar una correcta interpretación y predicción de los datos a partir de las cinéticas de crecimiento, es necesario su linealización y modelado. Existen varios

modelos matemáticos frecuentemente utilizados para predecir la respuesta de las microalgas a condiciones de estrés, como los cambios en factores ambientales (humedad, temperatura, luz, etc.) y cambios en los nutrientes del medio. Entre los modelos mayormente utilizados se encuentran: Schnute, Monod, Richards y Gompertz, entre otros (Sousa, Sousa, Vale, & Simoes, 2021).

En el presente proyecto, se utilizó el modelo de Gompertz, el cual es ampliamente utilizado en la descripción del crecimiento de plantas (incluidas microalgas), animales, bacterias e incluso de células cancerígenas. Este modelo es fácilmente aplicable pues únicamente requiere parámetros biológicos significativos como lo es la OD_{750 nm} y, en cambio, provee de información importante como lo son los parámetros cinéticos, es decir: la velocidad específica de crecimiento (μ máx), el tiempo de latencia (λ) y el tiempo de generación o de división celular (G), estos datos permiten evaluar si existe un correcto desarrollo de la biomasa, proporcionan información relativa a la toxicidad de agentes externos, como lo son los filtros UV, y muestran con exactitud las diferentes fases del crecimiento celular (latencia, exponencial, estacionaria y de muerte) (Khim, 2020).

La Ecuación 3 muestra el modelo de Gompertz.

$$Y = a \cdot \exp(-\exp(b - c * T)) \dots \dots \dots \text{Ec. 3}$$

Donde:

- Y - Densidad celular.
- T - Tiempo.
- a - Población inicial.
- b - Pendiente de la curva que describe la tasa de crecimiento.
- c - Tiempo en el cual la tasa de crecimiento es de mayor magnitud.

El cálculo de los parámetros cinéticos se realizó utilizando las constantes a , b y c generadas al resolver la ecuación del modelo de Gompertz como se indica a continuación:

- Velocidad específica de crecimiento (μ máx.) = $a \cdot c$

- Tiempo de latencia (λ) = $\frac{b-1}{c}$
- Tiempo de generación (g) = $\frac{\ln(2)}{\mu \text{ máx.}}$

Con la finalidad de obtener resultados con mayor confiabilidad, cada experimento se realizó por triplicado. Para comparar los datos obtenidos para cada tratamiento con los controles, además del cálculo de los parámetros cinéticos, se calculó la media y la desviación estándar.

En el caso del análisis de remoción, las concentraciones cuantificadas mediante HPLC se sometieron a un análisis de varianza (ANOVA) de dos vías, ya que únicamente se comparó la concentración de filtros UV definida con respecto al control, a un nivel de confianza del 95 %. Los gráficos y el modelado de datos se realizaron utilizando el software GraphPad Prism 5.0.

7. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

7.1 DETERMINACIÓN DEL MÉTODO DE CUANTIFICACIÓN DE OXIBENZONA Y HOMOSALATO MEDIANTE HPLC

Para la cuantificación de oxibenzona y homosalato mediante HPLC se utilizó, como se menciona en la sección 6.3.4, un equipo Agilent 1260 Infinity y una columna empacada con sílice C-18 esférica Eclipse XDB-C18, 5 μ M, 4.6 \times 150 mm marca Agilent. La columna se equilibró inicialmente con una solución de 0.1 % de ácido trifluoroacético en agua; la muestra se inyectó en un volumen de 50 μ L y se utilizó un gradiente lineal con un flujo de 0.6 mL/min y ácido trifluoroacético al 1 % en acetonitrilo como fase móvil a una temperatura de 35 °C. La detección de la oxibenzona se realizó utilizando un detector de arreglo de diodos (DAD) a una longitud de onda (λ) de 275 nm, mientras que para el homosalato se utilizó un detector de fluorescencia (FLD).

Para establecer el límite de detección de ambos filtros solares se probaron concentraciones de 0.05, 0.25, 0.5, 1, 2.5, 3, 5, y 10 mg/L, las cuales, en el caso de la oxibenzona, lograron cuantificarse de manera confiable desde la concentración de 5 mg/L, no obstante, en ninguna de las concentraciones probadas de homosalato se obtuvieron resultados confiables ya que la variación resultante indicaba degradación o precipitación.

7.2 DETERMINACIÓN DEL MÉTODO DE SOLUBILIZACIÓN DE OXIBENZONA Y HOMOSALATO

Para la solubilización de ambos filtros UV se utilizó inicialmente DMSO en una concentración del 10 %, sin embargo, esta opción se descartó debido a que los filtros UV precipitaron y causó toxicidad para las microalgas. Posteriormente se determinó la solubilidad de ambos filtros UV utilizando concentraciones de 1000, 10, 5 y 1 mg/L en etanol absoluto grado reactivo, donde se observó una solubilización eficiente.

A continuación, se procedió a evaluar el efecto de este solvente en la microalga *C. vulgaris* a través de una cinética de crecimiento, con la finalidad de encontrar una concentración de etanol que no resulte tóxica; para ello, se colocaron cultivos en presencia de etanol en concentraciones de 1, 5, 15 y 30 %.

Los parámetros cinéticos mostrados en la Tabla 4 indican que para la concentración de 30 % el tiempo de latencia (λ) fue mayor que para las concentraciones de 1, 5 y 15 %, es decir, las células necesitaron mayor tiempo de adaptación para crecer en presencia de etanol, así mismo, el tiempo de generación (G) y la velocidad de crecimiento específica (μ máx.) para la concentración de 1 % indican que las células crecieron a mayor velocidad en comparación con el control y la concentración de 5 % de etanol, mientras que para 15 y 30 % el resultado negativo de estos parámetros indican que ambas concentraciones son altamente tóxicas puesto que no hubo crecimiento; finalmente el valor de R^2 es mayor a 0.9 y más cercano al obtenido en el control únicamente con la concentración de 1 % de etanol.

En la Figura 4 es posible observar que no existe diferencia estadísticamente significativa en el crecimiento de *C. vulgaris* en presencia de etanol al 1 y 5 % en comparación con el control biológico mientras que para las concentraciones de 15 y 30% si hay diferencia significativa, no obstante, se considera negativa ya que se debe a la muerte celular. Los resultados y observaciones antes mencionados indican que las concentraciones de 1 y 5 % permiten un adecuado crecimiento de *C. vulgaris*, sin embargo, se eligió trabajar con la concentración de 1 % debido a que se disminuye el riesgo de intoxicación, hay mayor generación de biomasa en menor tiempo y permite economizar recursos del laboratorio.

Posteriormente se realizó una segunda cinética de crecimiento con *S. acutus*, donde, dada la evidente toxicidad del etanol al 15 y 30 % en *C. vulgaris* (por lo cual ya no se continuó con la toma de muestra después del día 7), se probaron únicamente las concentraciones de 1 y 5 % de etanol; resultando, como se observa en la Figura 4, que aunque no existe diferencia estadísticamente significativa entre ambas concentraciones, utilizando etanol al 1 % el crecimiento es mayor con respecto al control; mientras que los parámetros cinéticos en la Tabla 4, muestran

que no existe tiempo de latencia que indique toxicidad o dificultad de adaptación de la microalga ante la presencia de etanol en ambas concentraciones y que la velocidad específica de crecimiento, así como el tiempo de generación indican un crecimiento adecuado de la microalga.

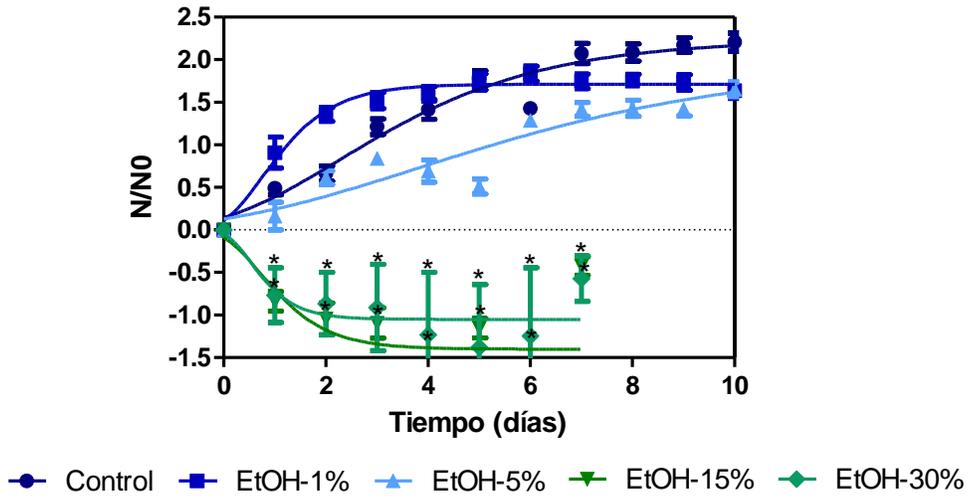
Al observar que tanto *C. vulgaris* como *S. acutus* pudieron adaptarse y crecer en presencia de una concentración de 1 % de etanol, se decidió utilizar esta concentración para ambas microalgas.

Tabla 4. Parámetros cinéticos de *C. vulgaris* y *S. acutus* expuestas a diferentes concentraciones de etanol en medio Bold basal.

Parámetros cinéticos	Control		EtOH 1 %		EtOH 5 %		EtOH 15 %	EtOH 30 %
	<i>Cv</i> *	<i>Sa</i> **	<i>Cv</i>	<i>Sa</i>	<i>Cv</i>	<i>Sa</i>	<i>Cv</i>	<i>Cv</i>
μ máx. (días ⁻¹)	0.986	0.662	2.227	1.647	0.519	1.058	-1.925	-2.161
λ (días)	0.000	0.000	0.002	0.000	0.000	0.000	0.000	0.053
G (días)	0.703	1.048	0.311	0.421	1.336	0.655	-0.360	-0.321
R ²	0.945	0.971	0.955	0.931	0.857	0.825	0.403	0.323

**Cv*- *Chlorella vulgaris* ** *Sa*-*Scenedesmus acutus*

Evaluación del efecto de etanol en *Chlorella vulgaris*



Evaluación del efecto de etanol en *Scenedesmus acutus*

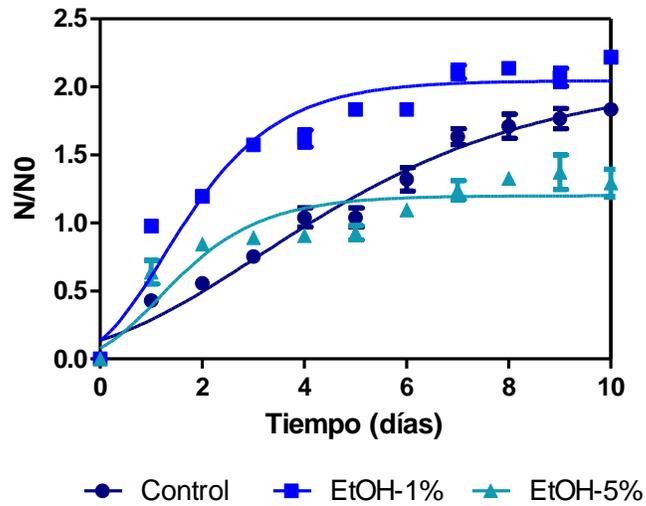


Figura 4. Efecto de diferentes concentraciones de etanol en *C. vulgaris* y *S. acutus* en medio Bold basal. Se puede observar que no existe diferencia significativa en el crecimiento de *C. vulgaris* y *S. acutus* en presencia de 1 y 5 % de etanol, mientras que las concentraciones de 15 y 30 % resultaron tóxicas para *C. vulgaris* en comparación con el control. Las diferencias estadísticamente significativas en el crecimiento con respecto al control a una $p < 0.05$ se indican con (*). Prueba de Dunnet.

Al continuar con los experimentos se observó que, al añadir los filtros solares en diferentes concentraciones, no se logró una correcta detección de homosalato y oxibenzona en el HPLC, posiblemente debido a que existe precipitación, por ello se optó por probar Tween 20 como agente solubilizante; para ello, se realizó una cinética de crecimiento utilizando Tween 20 en concentraciones de 0.1 y 0.5 % para ambas microalgas.

Al igual que con el etanol, los datos generados a partir de la cinética de crecimiento fueron procesados para su graficado y cálculo de los parámetros cinéticos. En la Figura 6 es posible observar que, aunque no existe diferencia estadísticamente significativa en el crecimiento de *C. vulgaris* y *S. acutus* en presencia de Tween 20 a una concentración de 0.1 y 0.5 % con respecto al control, el comportamiento de la curva que representa el crecimiento de ambas microalgas a una concentración de 0.1 % se asemeja al del control, mientras que a una concentración del 0.5 % el crecimiento se ve disminuido. Por otro lado, en la Tabla 5 donde se muestran los parámetros cinéticos, es posible observar que a una concentración de Tween 20 de 0.5 % el tiempo de latencia es mayor al del control, lo cual implica posible toxicidad, ya que existió dificultad por parte de las microalgas para adaptarse y entrar a fase exponencial, mientras que a una concentración de Tween 20 de 0.1 %, no existe tiempo de latencia para *C. vulgaris*, en tant para *S. acutus* es mayor que el control pero menor que con 0.5 % de Tween 20, es decir, existió menor tiempo de adaptación y las microalgas se encontraban desde el inicio entrando a fase exponencial; el tiempo de generación fue mayor al del control y la velocidad de crecimiento específica disminuyó para *C. vulgaris*, no obstante, hubo crecimiento.

Además, al realizar una inspección visual (Figura 5), ambas microalgas mostraron características similares con y sin agente solubilizante, aunado al análisis estadístico que indica que no existe diferencia significativa con respecto al control y a la información obtenida del análisis de los parámetros cinéticos, permitió definir que la concentración de 0.1 % de Tween 20 no implica toxicidad y es posible utilizar esta concentración para los posteriores experimentos.

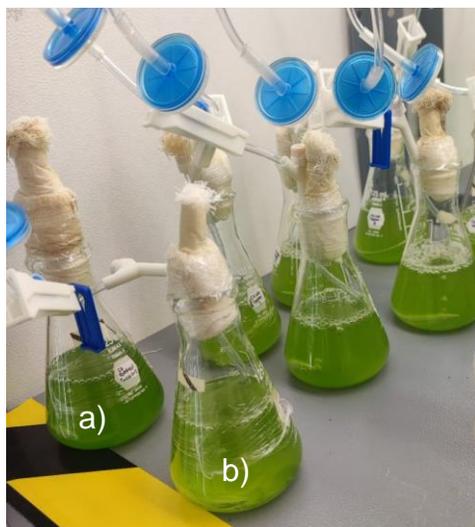


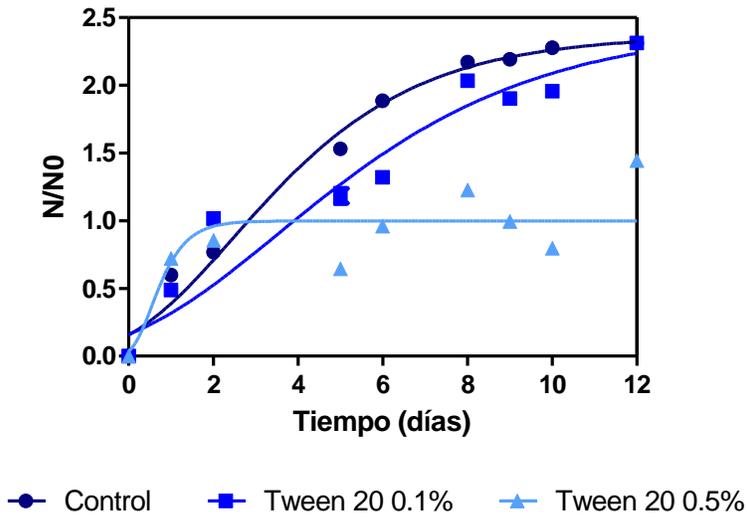
Figura 5. Crecimiento de *C. vulgaris* y *S. acutus* en presencia de Tween 20 0.1 %. Se observa que el crecimiento de los controles de a) *C. vulgaris* y b) *S. acutus* es similar al crecimiento de ambas algas en presencia de Tween 20 a una concentración de 0.1 %.

Tabla 5. Parámetros cinéticos de *C. vulgaris* y *S. acutus* expuestas a diferentes concentraciones de Tween 20 en medio Bold basal.

Parámetros cinéticos	Control		Tween 20 0.1 %		Tween 20 0.5 %	
	Cv*	Sa**	Cv	Sa	Cv	Sa
μ máx (días ⁻¹)	0.9601	0.7204	0.6952	0.8123	2.2005	1.8096
λ (días)	0.0000	0.0280	0.0000	0.3065	0.0944	0.3355
G (días)	0.7220	0.9621	0.9970	0.8533	0.3150	0.3830
R ²	0.9817	0.9841	0.911	0.954	0.6657	0.9676

*Cv- *Chlorella vulgaris* ** Sa-*Scenedesmus acutus*

Efecto de Tween 20 en *Chlorella vulgaris*



Efecto del Tween 20 en *Scenedesmus acutus*

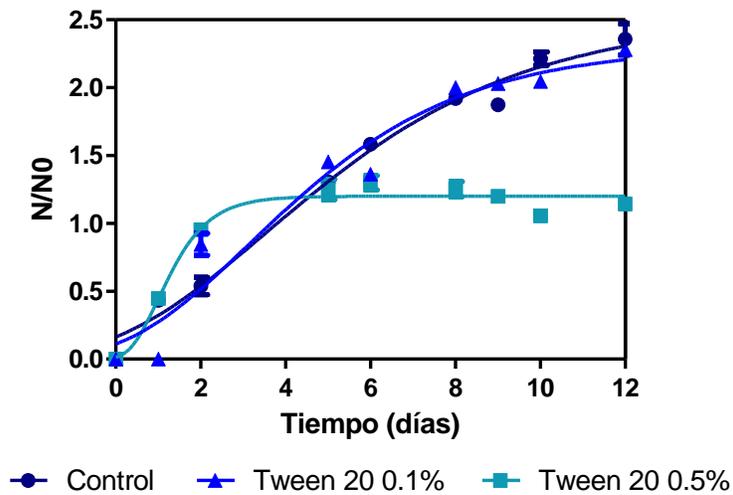


Figura 6. Efecto del Tween 20 en *C. vulgaris* y *S. acutus* en medio Bold basal.

A pesar de que no existe diferencia estadísticamente significativa en el crecimiento de ambas microalgas con respecto al control, se puede observar que la concentración de 0.1 % de Tween 20 permite un crecimiento adecuado de ambas microalgas mientras que en presencia de Tween 20 al 0.5 % el crecimiento disminuye. Las diferencias estadísticamente significativas en el crecimiento con respecto al control a una $p < 0.05$ se indican con (*). Prueba de Dunnet

7.3 DETERMINACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN DE OXIBENZONA Y HOMOSALATO

Una vez seleccionado el Tween 20 al 0.1 % como agente solubilizante, se prosiguió a definir la concentración a utilizar de homosalato y oxibenzona, para lo cual fue necesario probar diferentes concentraciones, descartando aquellas que resultaron tóxicas para las microalgas.

Ramos y colaboradores en 2015 reportaron la cuantificación de contaminantes emergentes en diferentes matrices de agua, siendo la concentración más alta encontrada de 3.5756×10^{-3} mg/L de oxibenzona en agua de río y de 6.079×10^{-4} mg/L de homosalato en agua de mar (Ramos, Homem, Alves, & Santos, 2015), no obstante, debido a que se trata de contaminantes emergentes cuya presencia aumenta al paso del tiempo se propuso comenzar a probar concentraciones más altas, por lo que inicialmente se utilizó medio Bold basal y concentraciones de 1 mg/L, 0.5 mg/L, 0.25 mg/L y 0.05 mg/L de oxibenzona y homosalato. Visualmente las microalgas presentaron características muy parecidas a las del control y estadísticamente no se observó diferencia significativa en el crecimiento de las microalgas en presencia de los filtros solares en comparación con el control biológico (Figura 7), por lo que, al no haber una toxicidad evidente, se procedió al análisis de los datos obtenidos a lo largo de la cinética.

Siguiendo el procedimiento descrito en los apartados anteriores, se realizó el cálculo de los parámetros cinéticos. Los datos obtenidos para *C. vulgaris* y *S. acutus* en presencia de oxibenzona se muestran en Tablas 6 y 7, respectivamente, mientras que las Tablas 8 y 9 incluyen los datos para ambas microalgas en contacto con el homosalato. Se observó que todas las concentraciones permitían el crecimiento de las microalgas sin embargo la oxibenzona en concentración de 0.25 y 0.5 mg/L generó tiempo de latencia mayor al del control para *C. vulgaris* y *S. acutus* respectivamente mientras que únicamente hubo tiempo de latencia con homosalato a 0.05 mg/L para *S. acutus*, además, en presencia de oxibenzona el tiempo de generación y la velocidad de crecimiento específica fueron muy similares a las del control. Por su parte, el coeficiente de correlación para la concentración de

1 mg/L fue el más alto y cercano al control en casi todos los casos, por lo que se consideró como la concentración óptima a utilizar, no obstante, al ser concentraciones tan pequeñas no fue posible obtener datos confiables al realizar la cuantificación de los filtros UV mediante HPLC, generando la necesidad de probar el efecto de concentraciones más altas tanto de oxibenzona como de homosalato.

Tabla 6. Parámetros cinéticos de *C. vulgaris* expuestas a diferentes concentraciones de oxibenzona en medio Bold basal.

Parámetros cinéticos	Control	1 mg/L	0.5 mg/L	0.25 mg/L	0.05 mg/L
μ máx (días ⁻¹)	0.6031	0.7273	0.554	3.2861	2.1001
λ (días)	0.0000	0.000	0.0000	0.0279	0.0000
G (días)	1.1494	0.9508	1.2503	0.2109	0.3301
R ²	0.9549	0.9883	0.9425	0.7942	0.9031

Tabla 7. Parámetros cinéticos de *S. acutus* expuestas a diferentes concentraciones de oxibenzona en medio Bold basal.

Parámetros cinéticos	Control	1 mg/L	0.5 mg/L	0.25 mg/L	0.5 mg/L
μ máx (días ⁻¹)	0.723	0.6088	4.5775	1.0836	1.4477
λ (días)	0.000.	0.0000	0.1889	0.0000	0.0000
G (días)	0.9508	1.1386	0.1514	0.6397	0.4788
R ²	0.9883	0.7861	0.4212	0.8417	0.8393

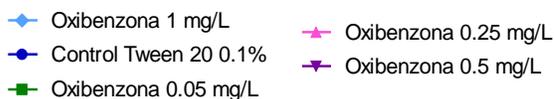
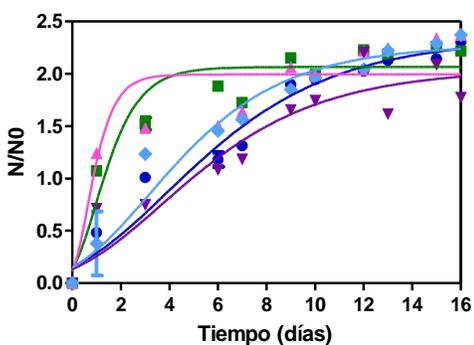
Tabla 8. Parámetros cinéticos de *C. vulgaris* expuestas a diferentes concentraciones de homosalato en medio Bold basal.

Parámetros cinéticos	Control	1 mg/L	0.5 mg/L	0.25 mg/L	0.05 mg/L
μ máx (días ⁻¹)	0.6031	0.7732	0.7083	1.2693	2.2208
λ (días)	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000
G (días)	1.1494	0.8965	0.9786	0.5461	0.3121
R ²	0.9549	0.9287	0.7931	0.888	0.9066

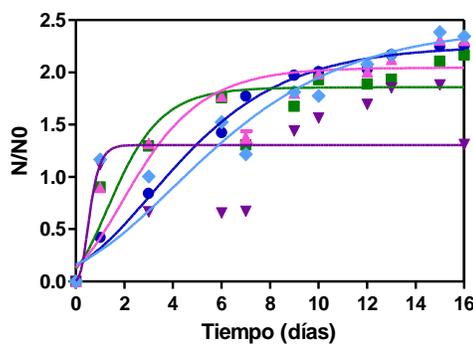
Tabla 9. Parámetros cinéticos de *S. acutus* expuestas a diferentes concentraciones de homosalato en medio Bold basal.

Parámetros cinéticos	Control	1 mg/L	0.5 mg/L	0.25 mg/L	0.05 mg/L
μ máx (días ⁻¹)	0.0824	0.5571	0.5395	2.8053	3.4418
λ (días)	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0722
G (días)	8.4077	1.2442	1.2847	0.2471	0.2014
R ²	0.9883	0.8165	0.8073	0.7549	0.7991

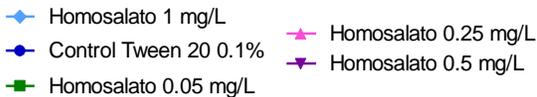
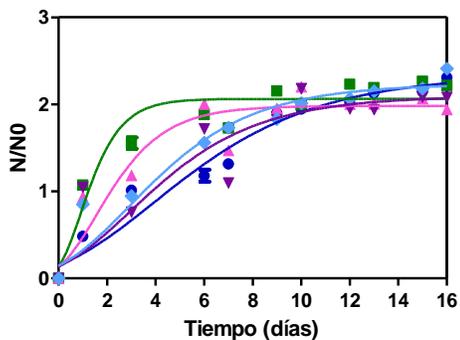
Efecto de oxibenzona en *Chlorella vulgaris*



Efecto de la oxibenzona en *Scenedesmus acutus*



Efecto del homosalato en *Chlorella vulgaris*



Efecto del homosalato en *Scenedesmus acutus*

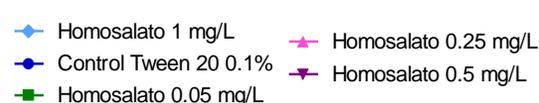
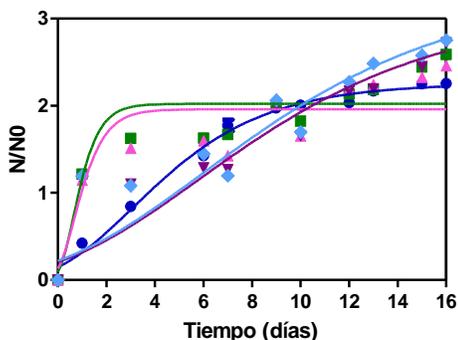


Figura 7. Efecto de diferentes concentraciones de oxibenzona y homosalato en el crecimiento de *C. vulgaris* y *S. acutus* en medio Bold basal. Se puede

observar que no existe diferencia estadísticamente significativa en el crecimiento de ambas microalgas en presencia de oxibenzona y homosalato a concentraciones de 0.05, 0.25, 0.5 y 1 mg/L. Las diferencias estadísticamente significativas en el crecimiento con respecto al control a una $p < 0.05$ se indican con (*). Prueba de Dunnet.

Para continuar, se realizaron cinéticas de crecimiento donde se probaron concentraciones de 1, 5 y 10 mg/L de oxibenzona y homosalato en *C. vulgaris*, una vez evaluado el comportamiento de esta microalga con las nuevas concentraciones de filtros UV.

En la Tabla 10 se incluyen los parámetros cinéticos del crecimiento de *C. vulgaris* en presencia de oxibenzona. Es posible notar cómo en la concentración de 10 mg/L el tiempo de latencia indica que las células necesitaron de un tiempo prolongado para adaptarse; mientras que la velocidad específica de crecimiento, así como el tiempo de generación indican una menor duración de la fase exponencial en comparación con el control, lo cual es sinónimo de menor generación de biomasa, es decir, posible toxicidad. Por otro lado, la concentración de 5 mg/L permitió un mayor crecimiento celular en contraste con el control. Ya que no existió tiempo de latencia, es posible suponer que no hubo complicaciones en la adaptación a la presencia de oxibenzona a estas dos concentraciones, lo cual puede observarse de manera gráfica en la Figura 8 a pesar de que no existe diferencia estadísticamente significativa en el crecimiento de *C. vulgaris* en presencia de ninguna de las concentraciones probadas en comparación con el control. Como se pretende obtener los datos de remoción de la mayor concentración de filtros UV tolerable por las microalgas, se definió la concentración de 5 mg/L de oxibenzona como seleccionada para evaluar.

En el caso del homosalato, los parámetros cinéticos mostrados en la Tabla 11 y el comportamiento mostrado en la Figura 8 permiten observar que la generación de biomasa en comparación con el control fue menor. En el caso de las concentraciones de 1 y 5 mg/L se requirió de cierto tiempo de adaptación ya que los valores del tiempo de latencia son elevados, sin embargo, hubo crecimiento y la

tendencia es muy similar a la del control, no así para la concentración de 10 mg/L donde la fase exponencial fue mucho menor, y aunque el tiempo de adaptación fue menor en comparación con las de 1 y 5 mg/L, la temprana llegada de la fase estacionaria indica que no habrá más generación de biomasa, por lo que nuevamente se definió a la concentración de 5 mg/L como la opción para continuar con el proyecto.

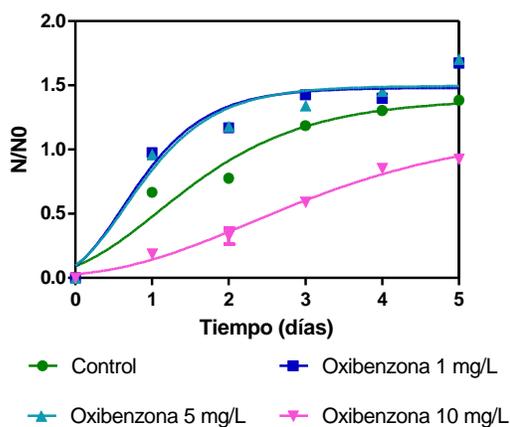
Tabla 10. Parámetros cinéticos de *C. vulgaris* expuestas a concentraciones de 1, 5 y 10 mg/L de oxibenzona en medio Bold basal.

Parámetros cinéticos	Control	1 mg/L	5 mg/L	10 mg/L
μ máx. (días ⁻¹)	1.2947	2.4390	2.3158	0.6772
λ (días)	0.0000	0.0073	0.0000	0.5574
G (días)	0.5354	0.2842	0.2993	1.0235
R ²	0.9512	0.9475	0.9417	0.9853

Tabla 11. Parámetros cinéticos de *C. vulgaris* expuestas a concentraciones de 1, 5 y 10 mg/L de homosalato en medio Bold basal.

Parámetros cinéticos	Control	1 mg/L	5 mg/L	10 mg/L
μ máx. (días ⁻¹)	1.2947	0.7728	0.8876	2.2667
λ (días)	0.0000	1.5131	0.3186	0.1443
G (días)	0.5354	0.8969	0.7809	0.3058
R ²	0.9512	0.9821	0.9735	0.9649

Efecto de la oxibenzona en *Chlorella vulgaris*



Efecto del homosalato en *Chlorella vulgaris*

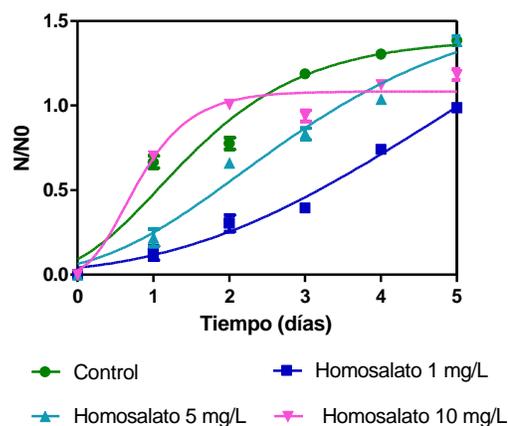


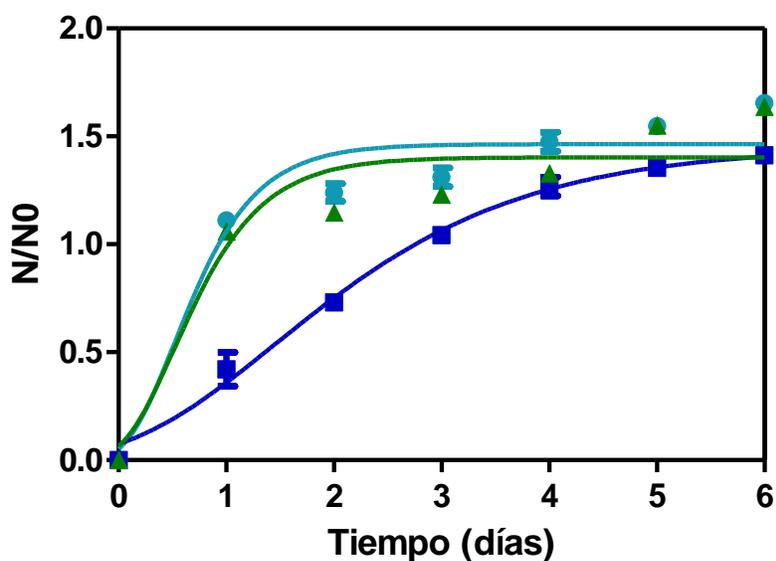
Figura 8. Efecto de 1, 5 y 10 mg/L de oxibenzona y homosalato en el crecimiento de *C. vulgaris* en medio Bold basal. Se puede observar que existe un mejor crecimiento al utilizar la concentración de 5 mg/L en ambos filtros UV. Las diferencias estadísticamente significativas en el crecimiento con respecto al control a una $p < 0.05$ se indican con (*). Prueba de Dunnet.

Hasta este punto se había definido la concentración de 5 mg/L de ambos filtros solares como la concentración a utilizar para *C. vulgaris*, sin embargo, de nueva cuenta al realizar la cuantificación mediante HPLC, los resultados indicaron variaciones, probablemente ocasionadas por el medio de cultivo, que no permitieron concluir que los resultados fueran confiables, por ello se procedió a sustituir el medio Bold basal por medio TAP para *S. acutus* utilizando las concentraciones de 5 y 10 mg/L únicamente de oxibenzona ya que para el homosalato no se logró obtener datos de cuantificación confiables debido a una posible fotodegradación o precipitación, incluso con el cambio de medio.

En la Figura 9 se muestra el crecimiento de *S. acutus* durante los 6 días de la cinética; es posible observar cómo, aunque no existe diferencia estadísticamente significativa, el crecimiento a una concentración de 5 mg/L de oxibenzona es mayor que el de 10 mg/L y con mayor similitud al mostrado en el control, además, los parámetros cinéticos incluidos en la Tabla 12 muestran un tiempo de latencia despreciable y una velocidad de crecimiento específica, así como un tiempo de

generación, con la misma tendencia que los del control para las concentraciones de 1 y 5 mg/L pero un tiempo de latencia más prolongado para la concentración de 10 mg/L además de una velocidad de crecimiento específica y un tiempo de generación menores, lo cual, como ya se ha mencionado anteriormente, implican posible toxicidad y por lo tanto menor desarrollo de biomasa. Debido a lo anteriormente expuesto, nuevamente se definió la concentración de 5 mg/L como la más conveniente a utilizar en los próximos experimentos para *S. acutus* con medio TAP.

Efecto de la oxibenzona en *Scenedesmus acutus*



—●— Control —▲— Oxibenzona 5 mg/L —■— Oxibenzona 10 mg/L

Figura 9. Efecto de 5 y 10 mg/L de oxibenzona en el crecimiento de *S. acutus* en medio TAP. Se observa que la concentración de 5 mg/L tiene un mejor crecimiento en comparación con el control, aunque no existe diferencia significativa. La diferencia estadísticamente significativa en el crecimiento con respecto al control a una $p < 0.05$ se indica con (*). Prueba de Dunnet.

Tabla 12. Parámetros cinéticos de *S. acutus* expuestas a concentraciones de 5 y 10 mg/L de oxibenzona en medio TAP.

Parámetros cinéticos	Control	BP3 5 mg/L	BP3 10 mg/L
μ máx (días ⁻¹)	3.4038	3.0291	1.0915
λ (días)	0.0856	0.0551	0.1159
G (días)	0.2036	0.2288	0.6350
R ²	0.942	0.9084	0.9895

Cabe mencionar que, aunque en este proyecto no se pretende encontrar la concentración IC₅₀ sino la capacidad de remoción de las microalgas ya mencionadas, los resultados obtenidos contrastan con los reportados por Walton en 2019 quien encontró que para *S. acutus* la concentración inhibitoria del crecimiento con oxibenzona fue de 1.94 mg/L mientras que para homosalato fue de 0.4 mg/L a las 96 h (Walton, 2018). Por su parte Lee y colaboradores, en 2020 probaron el efecto de oxibenzona en *S. obliquus* donde, según lo reportado, el crecimiento de esta microalga se inhibió a una concentración de 3.64 mg/L también a las 96 h (Lee, et al., 2020), además, para *Chlamydomonas reinhardtii*, Mao y colaboradores reportan una concentración inhibitoria de 1.85 ± 0.41 mg/L (Mao, He, Kushmaro, & Gin, 2017), mientras que para la misma microalga, Esperanza y colaboradores en 2019, reportan una concentración inhibitoria de 5 mg/L, lo cual demuestra que los diferentes efectos dependen no solo de la metodología utilizada en los experimentos, sino también de la sensibilidad de cada especie de microalgas, no obstante, aunque en este proyecto logró verse una aparente inhibición del crecimiento de ambas microalgas a una exposición de 10 mg/L, tanto *S. acutus* como *C. vulgaris* lograron crecer a una concentración de 5 mg/L. La diferencia encontrada respecto a los experimentos realizados por los autores ya mencionados radica en el método de aireación y a cambios en el medio de cultivo y con ello los componentes y fuentes de nitrógeno, fósforo, potasio y carbono, etc.

7.4 CUANTIFICACIÓN DE CLOROFILA

Uno de los parámetros más relevantes para evaluar la salud celular es la cuantificación de pigmentos como la clorofila, la cual se encuentra directamente relacionada con el fotosistema II y en la cadena de transporte de electrones que permite llevar a cabo los procesos fotosintéticos (Esperanza , Seoane, Rioboo, Herrero, & Cid, 2019). La disminución de clorofila, específicamente clorofila a, indica que existen alteraciones en el metabolismo de las microalgas ocasionadas por factores externos que puede traducirse como toxicidad.

Una vez definida la concentración de filtros UV se procedió con la cuantificación de clorofila a. Como se muestra en la Figura 10 y en el Anexo 1, para *C. vulgaris* únicamente hubo diferencia significativa a las 48 h, pero a las 72 h la clorofila a cuantificada en presencia de 5 mg/L de oxibenzona fue similar al control biológico, lo cual indica que la microalga pudo adaptarse a crecer en presencia de oxibenzona. En el caso de *S. acutus* se puede ver una disminución significativa a las 48 y 96 h, no obstante, la cinética de crecimiento se detuvo y no se pudieron obtener los datos necesarios para saber si existe recuperación después del tiempo evaluado.

Comparando estos resultados con lo reportado por Mao y colaboradores en 2017, quienes encontraron que el contenido de clorofila a se ve reducido desde las 24 h en *Chlamydomonas reinhardtii* en contacto con concentraciones de hasta 1 mg/L de oxibenzona (Mao, He, Kushmaro, & Gin, 2017), mientras que Esperanza y colaboradores en 2019 obtuvieron un incremento en la clorofila a utilizando la misma microalga con concentraciones de 2 mg/L, esta diferencia puede deberse a los métodos de cuantificación utilizados ya que Mao y colaboradores utilizaron espectrofotometría mientras que Esperanza y colaboradores cuantificaron mediante citometría de flujo. En cualquier caso, podemos observar que los resultados obtenidos en este proyecto indican una mejor tolerancia a la presencia de oxibenzona por parte de *C. vulgaris* en comparación con *S. acutus*.

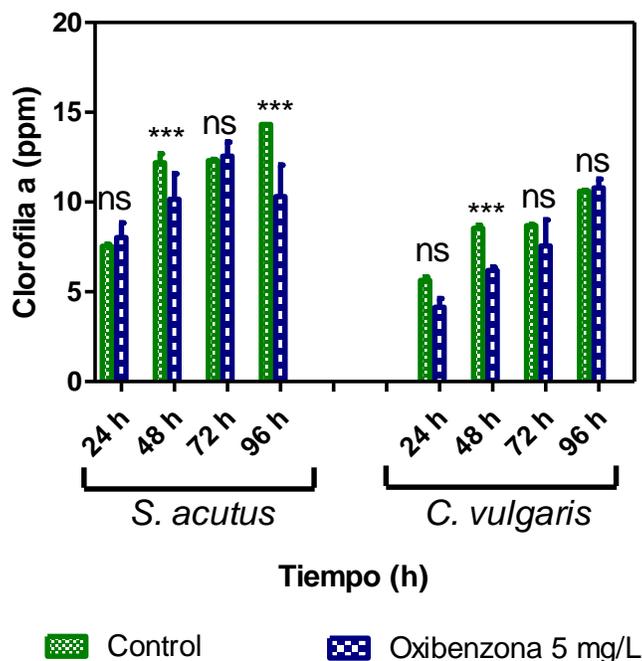


Figura 10. Cuantificación de clorofila a de *C. vulgaris* y *S. acutus* en presencia de 5 mg/L de oxibenzona. Se puede observar como la concentración de clorofila a disminuye de manera significativa en comparación con el control biológico a las 48 y 96 h en *S. acutus* mientras que en *C. vulgaris* únicamente disminuye a las 48 h, pero se recupera de las 72 a las 96 h. La diferencia significativa entre control y tratamiento a una $p < 0.05$ se indica con asteriscos (***) mientras que “ns” indica que no existe diferencia significativa.

7.5 ANÁLISIS POR HPLC PARA EVALUAR LA REMOCIÓN DE OXIBENZONA Y HOMOSALATO

Para iniciar con la evaluación de la remoción de filtros UV utilizando a las microalgas *C. vulgaris* y *S. acutus* se generó una curva de calibración estándar en HPLC utilizando concentraciones de 0.625, 1.25, 2.5 y 5 mg/L de oxibenzona previamente disuelta en etanol absoluto grado reactivo, para ello se utilizó un detector de arreglo de diodos. En el caso del homosalato se utilizó un detector de fluorescencia y las mismas concentraciones que para la oxibenzona, probando además concentraciones estándar de 0.5, 1, 2, 5 y 10 mg/L; como solvente se utilizó también

etanol absoluto grado reactivo y adicionalmente DMSO, no obstante, únicamente se logró obtener la curva de calibración estándar de la oxibenzona ya que para el homosalato se presentó alta variación de los resultados.

La recta de calibración estándar, así como la ecuación de la recta se muestran en la Figura 11.

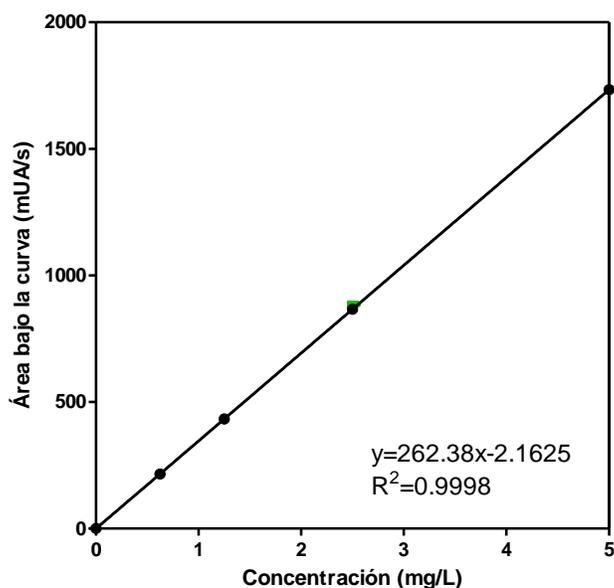


Figura 11. Recta de calibración estándar de oxibenzona. Se muestra la recta de calibración estándar de oxibenzona utilizando concentraciones de 0, 0.625, 1.25, 2.5 y 5 mg/L con un valor de $R^2 > 0.99$.

Se inició el análisis para evaluar la capacidad de remoción de 0.05, 0.25, 0.5 y 1 mg/L de oxibenzona y homosalato en medio Bold basal, no obstante, al ser concentraciones tan pequeñas no se obtuvieron datos confiables al cuantificar mediante HPLC.

Se continuó con la evaluación de 1, 5 y 10 mg/L de ambos filtros UV, inicialmente por parte de *C. vulgaris*, pensando en continuar con *S. acutus* una vez estandarizado el método, con la intención de evitar el uso innecesario de recursos. Para ello se tomó 1 mL de muestra cada 24 h y, como se indica en la metodología, se centrifugó para obtener el sobrenadante, el cual se analizó por HPLC para su cuantificación al momento de la toma de muestra o hasta un máximo de 24 h posteriores. Para la conservación de las muestras, estas fueron almacenadas a

temperatura ambiente y en condiciones de oscuridad para evitar fotodegradación y precipitación por disminución de temperatura.

Utilizando los datos del área bajo la curva obtenidos para oxibenzona, se calculó la concentración final, con lo cual se obtuvo también el porcentaje de remoción como se muestra en la Figura 12. Se puede observar que, en las tres concentraciones utilizadas, existe una disminución de la oxibenzona presente, aún para los controles sin biomasa. Así mismo, a las 48 h se alcanza arriba de un 90 % de remoción, mientras que para las 72 h ya no fue posible cuantificar la oxibenzona. En el caso del homosalato únicamente fue posible obtener los datos de área bajo la curva hasta las 24 h para los controles a las concentraciones de 1 y 5 mg/L, no obstante, es posible observar que de igual manera existe una disminución significativa de la presencia de ambos filtros UV aún en los controles sin biomasa.

En ambos casos la disminución en la concentración de oxibenzona en los controles sin biomasa indica que existe una fuerte degradación abiótica de los filtros UV, la cual podría tratarse de fotodegradación. Sin embargo, revisando la literatura, Rodil y colaboradores en 2009, realizaron también un estudio de la degradación de oxibenzona ocasionada por la luz solar donde, por lo menos hasta las 72 h, no se registró una disminución en la concentración (Rodil, Moeder, Altenburger, & Schmitt-Jansen, 2009). Otra posibilidad es que exista algún agente como componente del medio nutritivo que actúe como catalizador en el proceso de degradación, por ejemplo, nitratos. Liu y colaboradores en 2012 realizaron un estudio de la biodegradación de oxibenzona encontrando que, después del oxígeno, los nitratos son los principales agentes encargados de su degradación (Liu, Ying, Shareef, & Kookana, 2012).

En el Anexo 2 es posible apreciar que el porcentaje de reducción de la concentración de oxibenzona en los controles sin biomasa y de los ensayos en presencia de *C. vulgaris* varía de acuerdo con la concentración inicial, por ejemplo, para la concentración de 1 mg/L a las 24 h se obtuvo una reducción del 84.56 % para el control sin biomasa y un 81.59 % en presencia de biomasa, mientras que al colocar una concentración de 10 mg/L a las 24 h la oxibenzona disminuyó en un 99.24 % a las 24 h para el control sin biomasa y del 88.61 % para el ensayo en

presencia de *C. vulgaris*, esto comprueba que la variación de concentración no puede ser adjudicada a la presencia o ausencia de biomasa sino a algún factor externo como lo son los componentes del medio. Por esta razón se propuso realizar un cambio del medio nutritivo utilizado, sustituyéndolo por medio TAP, el cual contiene cloruro de amonio como fuente de nitrógeno en sustitución de los nitratos.

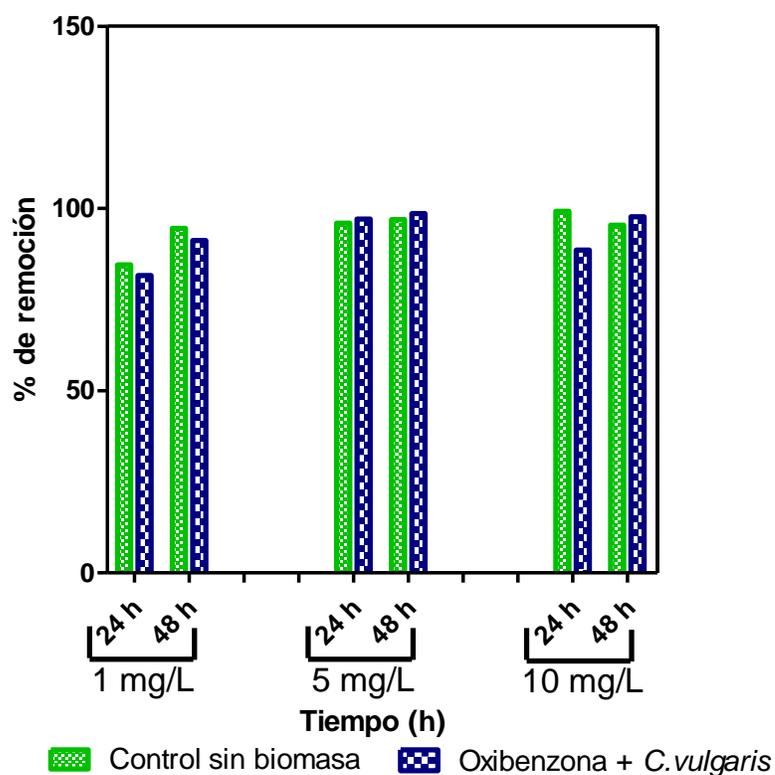


Figura 12. % de remoción de oxibenzona por *C. vulgaris* en medio Bold basal. Se observa que se logra alcanzar arriba de un 90 % de remoción a las 48 h en las tres concentraciones de oxibenzona utilizadas.

Para sustituir el medio nutritivo Bold basal, fue necesario un proceso de adaptación de las microalgas al medio TAP, por lo cual los siguientes experimentos se llevaron a cabo inicialmente con *S. acutus*, ya que fue la microalga de más rápida adaptación, y posteriormente con *C. vulgaris*. Además, debido a que el homosalato ya no es detectable por el equipo de HPLC incluso desde las 24 h y a que no se logró construir una curva de calibración confiable, se decidió continuar únicamente con la oxibenzona. Cabe mencionar que para tener más información respecto al

fenómeno de remoción del filtro UV y debido al cambio de componentes del medio TAP, donde en otros experimentos realizados en el laboratorio las microalgas han demostrado tener un crecimiento más rápido en comparación con el medio Bold basal, nuevamente se probaron concentraciones de 5 y 10 mg/L de oxibenzona.

Los resultados obtenidos se muestran en el Anexo 3 e indican que existe una disminución en la concentración de oxibenzona mayor al 90 % a las 48 h incluso en los controles sin biomasa (Figura 13), sin embargo, aún existen concentraciones cuantificables hasta las 96 h. Si bien puede pensarse que existe fotodegradación o precipitación, esto sucede con menor rapidez utilizando medio TAP, lo que implica que efectivamente los nitratos presentes en el medio Bold basal, que no están presentes en el medio TAP, podrían intervenir en la degradación de la oxibenzona.

Debido a que no se observa diferencia en los resultados al utilizar 5 mg/L y 10 mg/L de oxibenzona, se definió la concentración de 5 mg/L para posteriores experimentos puesto que la concentración de 10 mg/L parecía generar toxicidad para las microalgas.

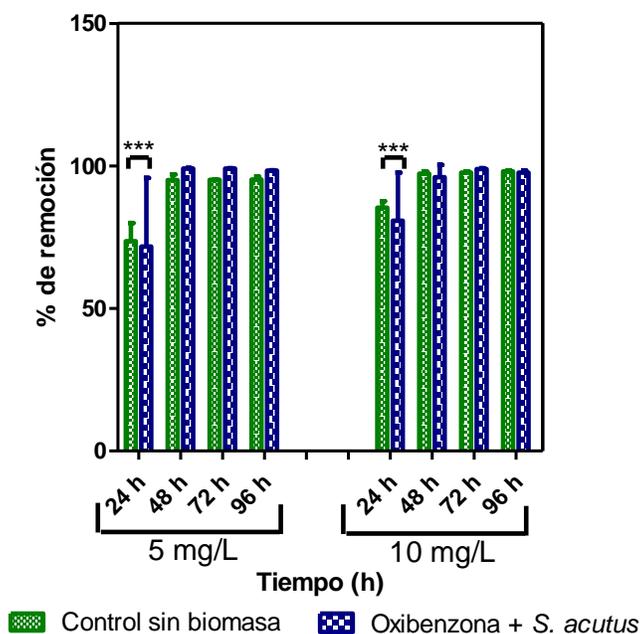


Figura 13. % de remoción de 5 y 10 mg/L de oxibenzona por *S. acutus* en medio TAP. Se observa que se logra alcanzar arriba de un 90 % de remoción a las 48 h en las dos concentraciones de oxibenzona utilizadas. La diferencia significativa en el % de remoción ($P > 0.05$) se indica con asteriscos (***). Prueba de Fisher.

A continuación, se probó nuevamente la capacidad de remoción de 5 mg/L de oxibenzona por *S. acutus*, sin embargo, se optó por reducir el tiempo de toma de muestra a 12 h para obtener información más específica respecto al tiempo de remoción, dado que hasta el momento se había logrado remover arriba del 90 % de la oxibenzona del medio a las 48 h.

Como se observa en el Anexo 4, se logra una remoción del 87.58 % a las 12 h y del 98.41 % a partir de las 72 h en los ensayos en presencia de *S. acutus*, a diferencia de los controles sin biomasa donde la reducción de la concentración por fenómenos no biológicos es del 53.93 % a las 12 h y la mayor remoción alcanzada es del 80.17 % a las 84 h. En la Figura 14 se puede observar que desde las 12 h existe una diferencia significativa en la disminución de la concentración de oxibenzona presente en el medio al inocular con la microalga *S. acutus* donde se logra una remoción máxima del 99.84 % en comparación con los controles no biológicos.

Dentro de la literatura revisada, se encontró que Lee y colaboradores en 2020 evaluaron la capacidad de remoción de oxibenzona utilizando *S. obliquus*, para lo cual también evaluaron los factores abióticos de remoción, con la finalidad de descartar este efecto y poder atribuir sus resultados únicamente a la microalga. Este estudio sirve de referencia, ya que utilizaron los mismos fotoperiodos de 16 h luz y 8 h oscuridad en medio Bold basal y pudieron descartar la existencia de fotodegradación, lo cual contrasta con lo observado al inicio de los experimentos de remoción de este proyecto. Como ya se había mencionado, dentro de las principales diferencias experimentales se encuentra la oxigenación en sus experimentos, Lee y colaboradores únicamente agitaban los biorreactores cada 24 h de manera mecánica, mientras que en este proyecto la aireación se mantiene constante a lo largo de las 96 h de cultivo (Lee, et al., 2020).

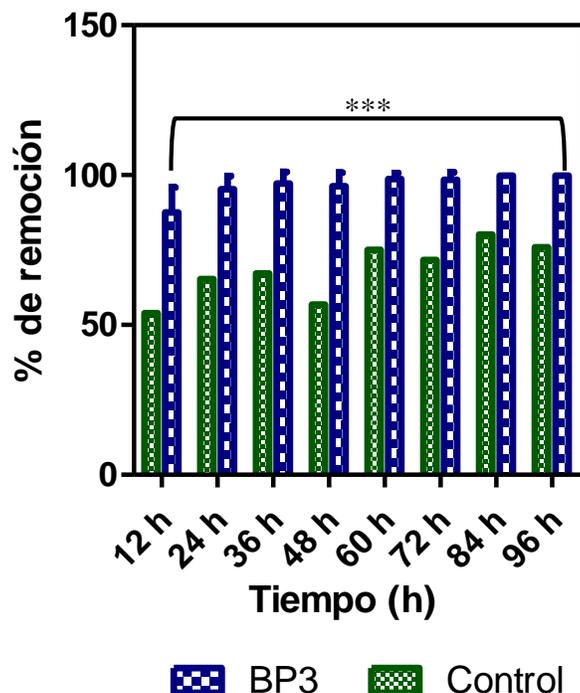


Figura 14. % de remoción de 5 mg/L de oxibenzona a las 96 h por *S. acutus* en medio TAP. Se observa que se logra alcanzar una remoción mayor al 90 % a partir de las 24 h, así como que existe una diferencia significativa (***) en presencia de la microalga *S. acutus* con respecto al control sin biomasa ($p > 0.05$). Prueba de Fisher.

Una vez lograda la adaptación de *C. vulgaris* al medio TAP se prosiguió con la evaluación de la remoción de oxibenzona, nuevamente con un tiempo de toma de muestra de 12 h.

Analizando los datos del Anexo 5, es posible notar que la máxima disminución de la concentración de oxibenzona se alcanza a las 96 h con un 88.25 % en los controles sin biomasa y del 98.92 % a las 72 h en presencia de la microalga, es decir, sigue estando presente algún factor externo al biológico que contribuye a este fenómeno, sin embargo, efectivamente existe una diferencia significativa en la remoción de oxibenzona por acción de *C. vulgaris* como se observa en la Figura 15.

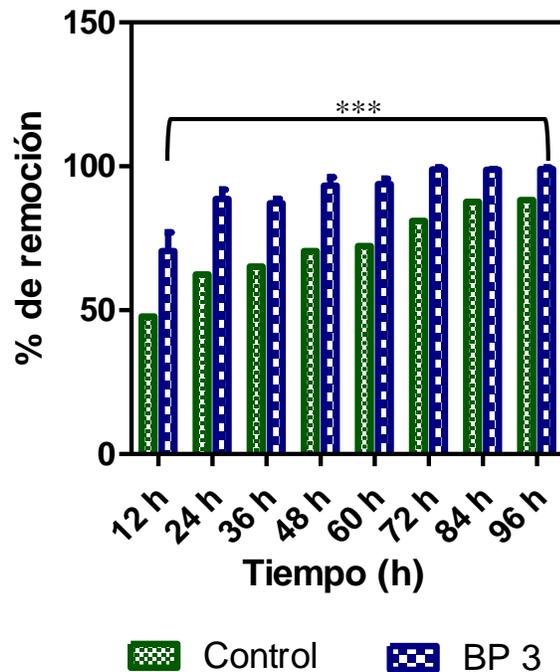


Figura 15. % de remoción de oxibenzona por *C. vulgaris* en medio TAP. Se observa que se logra alcanzar el 99 % de remoción a las 96 h ($p > 0.05$). Prueba de Fisher.

7.6 DESORCIÓN DE LA PARED CELULAR

De manera simultánea a la evaluación de la remoción de los filtros UV realizada por *C. vulgaris* y *S. acutus* en medio TAP, se analizó la desorción de la pared celular, de igual manera mediante HPLC. La finalidad de este estudio fue corroborar qué porcentaje de la pérdida de los filtros UV se debió a un proceso de adsorción en la pared celular de las microalgas utilizadas.

Para este proceso, se tomaron alícuotas de 50 mL al final de la cinética (96 h), las cuales fueron centrifugadas durante 10 min a 4000 rpm retirando el sobrenadante. Posteriormente se añadió 1 mL de etanol absoluto grado reactivo y se resuspendió con ayuda de vórtex hasta dispersar el pellet por completo. Se centrifugó por segunda ocasión bajo las mismas condiciones para retirar y analizar el sobrenadante mediante HPLC.

El porcentaje de adsorción de oxibenzona se muestra en la Tabla 13 donde es posible notar que efectivamente un porcentaje de oxibenzona es adsorbido en la pared celular.

Tabla 13. Análisis de remoción de oxibenzona de *C. vulgaris* y *S. acutus* utilizando medio TAP. Se muestran los porcentajes de remoción por células (adsorción y absorción) y fotólisis.

Remoción de 5 mg/L de oxibenzona				
Microalga	Tiempo (h)	% de adsorción	% absorción	% fotólisis
<i>Chlorella vulgaris</i>	96	0.96	10.60	88.20
<i>Scenedesmus acutus</i>	96	1.06	22.89	76.00

Al realizar el cálculo de la concentración adsorbida y compararla con la concentración final presente en el sobrenadante en la evaluación de la remoción de oxibenzona, se encontró que la suma de ambas concentraciones no es igual a la concentración inicial de 5 mg/L, lo cual indica que además de la adsorción existen otros métodos de remoción como la absorción y la fotólisis. Además, como se observó en los apartados anteriores, al cuantificar la oxibenzona en el control abiótico también disminuyó la concentración, esto indica que efectivamente una fracción de la concentración de oxibenzona se pierde por fenómenos no biológicos, sin embargo, el uso de microalgas mejora el proceso de remoción por lo que es una alternativa para su implementación en el tratamiento de agua contaminada con oxibenzona.

En la Tabla 13 se incluyen los porcentajes de remoción generados por las microalgas, los cuales son de 11.56 % para *C. vulgaris* y de 23.95 % para *S. acutus*. A pesar de que los porcentajes de remoción son mayores para los factores abióticos, como la fotólisis; los resultados obtenidos en el presente proyecto resultan satisfactorios pues coinciden con los reportados en la literatura por Lee y colaboradores, quienes indican que con la microalga *S. obliquus* se logra una

remoción del 23.3 al 28.5 % utilizando concentraciones de oxibenzona de 0.1 a 3 mg/L (Lee, et al., 2020), en contraste con lo reportado por Mao y colaboradores en 2017, con un 58.4 % de remoción a una concentración de 0.01 ng/L mientras que para la concentración de 5 mg/L únicamente se le puede atribuir una remoción del 10 al 12 % en *Chlamydomonas reinhardtii* (Mao, He, Kushmaro, & Gin, 2017), lo cual indica que la efectividad de las microalgas puede variar y disminuye conforme aumenta la concentración de este filtro UV.

8. CONCLUSIONES

En la primera etapa se determinó que el etanol absoluto grado reactivo a una concentración de 1 % permite la disolución de la oxibenzona y no resulta tóxico para *C. vulgaris* y *S. acutus*, no obstante, los parámetros cinéticos obtenidos demuestran que el Tween 20 al 0.1 % permite un mejor crecimiento de las microalgas en comparación con el control sin agente solubilizante.

De las concentraciones utilizadas, la concentración de 5 mg/L tanto de oxibenzona como de homosalato permite un crecimiento adecuado de biomasa para ambas microalgas, sin embargo, al no lograr cuantificar las concentraciones de homosalato, se continuó únicamente con la evaluación del efecto de oxibenzona.

La cuantificación de clorofila a indica que *C. vulgaris* tiene la capacidad de crecer sin aparente toxicidad en presencia de 5 mg/L de oxibenzona, ya que únicamente se obtuvo una diferencia significativa a las 48 h, pero la concentración se recuperó a partir de las 72 h. En contraste, *S. acutus* presentó una diferencia significativa en la disminución de la concentración de clorofila a las 48 y 96 h, sin embargo, los parámetros cinéticos indican que a una concentración de 5 mg/L de oxibenzona hubo incremento de biomasa para ambas microalgas, iniciando directamente en fase exponencial, lo cual indica que no hubo fase de adaptación debida a toxicidad por parte de la oxibenzona.

Mediante el análisis de desorción se determinó que *C. vulgaris* remueve el 11.56 % de oxibenzona, de lo cual el 0.96 % corresponde a adsorción y el 10.6 % a absorción. En el caso de *S. acutus*, el 1.06 % de la oxibenzona es removida mediante adsorción mientras que el 22.89 % es eliminado por absorción, generando un total del 23.95 % de remoción atribuido a las células. El resto de la oxibenzona removida se atribuye hasta el momento a un proceso de fotodegradación.

A pesar de que los resultados de la cuantificación de clorofila a de *C. vulgaris* fueron similares a los del control biológico en presencia de 5 mg/L de oxibenzona en comparación con *S. acutus* donde al finalizar la cinética existió una disminución significativa, lo cual indica cierta dificultad de adaptación por parte de la microalga; *S. acutus* tiene mayor capacidad de remoción.

La acumulación de los filtros UV en los cuerpos de agua indica que la fotodegradación no es suficiente para evitar o prevenir el incremento de la concentración de oxibenzona, por lo que en sinergia con las microalgas es posible lograr una disminución desde el tratamiento previo a su descarga.

9. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Andrade, C., Vera, A., Cárdenas, C., & Morales, E. (2009). Biomass production of microalga *Scenedesmus* sp. with wastewater from fishery. *Revista Técnica de la Facultad de Ingeniería, Universidad del Zulia*, 32(2), 126-134.
- Arellano, I., Alcalá, D., Barba, J., Carlos, B., Castanedo, J., de la Barrera, F., . . . Valencia, A. (2014). Recomendaciones clínicas para la fotoprotección en México. *Dermatología cosmética, médica y quirúrgica*, 12(4), 243-255.
- Arredondo Vega, B., Voltolina, D., Zenteno Savín, T., Arce Montoya, M., & Gómez Anduro, G. (2017). Métodos y herramientas analíticas en la evaluación de la biomasa microalgal (2° Edición). La Paz, Baja California, México: Perkin Elmer.
- Esperanza, M., Seoane, M., Rioboo, C., Herrero, C., & Cid, A. (2019). Differential toxicity of the UV filters BP-3 and BP-4 in *Chlamydomonas reinhardtii*: A flow cytometric approach. *Science of the total environment*(669), 412-420. doi:10.1016/j.scitotenv.2019.03.116
- Fent, K., Zenker, A., Rapp, M., & Kunz, P. (2010). A tentative environmental risk assessment of the UV-filters 3-(4-methylbenzylidene-camphor), 2-ethylhexyl-4-trimethoxycinnamate, benzophenone-3, benzophenone-4 and 3-benzylidene camphor. *Marine Environmental Research*(69), S4-S6. doi:10.1016/j.marenvres.2009.10.010
- Fitt, W., & Hoffmann, D. (2020). The effect of the UV-blockers oxybenzone (benzophenone-3) on planulae swimming and metamorphosis of the *Scyphozoans* *Cassiopea xamachana* and *Cassiopea frondosa*. *Oceans*, 1(4), 174-180. doi:10.3390/oceans1040013
- Fraga Dominguez, I. (2012). Reducción de microcontaminantes orgánicos persistentes en medios acuosos: fotodegradación directa y degradación fotocatalizada de propanol en agua de mar. (Tesis de maestría). *Pontevedra, España: Campus do Mar, Universidad Vigo*.
- Gil, M., Soto, A., Usma, J., & Gutiérrez, O. (2012). Contaminantes emergentes en aguas, efectos y posibles tratamientos. *Revista Producción Limpia*, 7(2), 52-73.
- Gómez, L., Tormos, L., & Ortega, Y. (2022). Cultivo y aplicaciones de *Chlorella vulgaris*: principales tendencias y potencialidades en la agricultura. *Tecnología Química*, 42(1), 70-93.
- Instituto Mexicano de Tecnología del Agua. (16 de Noviembre de 2018). *El desafío de los contaminantes emergentes, Blog Gobierno de México*.
- Jha, S., Shukla, R., Singh, R., Shukla, M., Srivastava, P., Pandey, A., & Dikshit, A. (2023). Phyco-remediation: Role of microalgae in remediation of emerging contaminants. In *Emerging Contaminants and Plants: Interactions, Adaptations and Remediation Technologies* (pp. 163-192). Springer International Publishing. doi:10.1007/978-3-031-22269-6_7
- Khan, N., Khan, S., Ahmed, S., Farooqi, I., Yousefi, M., Mohammadi, A., & Changani, F. (2020). Recent trends in disposal and treatment technologies of emerging pollutants a critical review. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 122. doi:10.1016/j.trac.2019.115744

- Khim, H. (2020). Fitting the Gompertz equation to asymmetric breakthrough curves. *Journal of environmental chemical engineering*, 8(Issue 3), 2213-3437. doi:10.1016/j.jece.2020.103713
- Layton, S. (2015). UV Filters as common organic water contaminants: A toxicological study of selected UV filters on *Daphnia magna*, a monitoring study of selected Oklahoma lakes, and the development of an undergraduate endocrine disruption. (Tesis de Doctorado). Stillwater, Oklahoma, Facultad del colegio de graduados de la Universidad de Oklahoma.
- Lee, S.-H., Xiong, J.-Q., Ru, S., Patil, S., Kurade, M., Govindwar, S., . . . Jeon, B.-H. (2020). Toxicity of benzophenone-3 and its biodegradation in a freshwater microalgae *Scenedesmus obliquus*. *Journal of Hazardous Materials*(389), 122149. doi:10.1016/j.jhazmat.2020.122149
- Liu, Y., Ying, G., Shareef, A., & Kookana, R. (2012). Biodegradation of the ultra violet filter benzophenone 3 under different redox conditions. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 3(2), 289-295. doi:10.1002/etc.749
- Mao, F., He, Y., Kushmaro, A., & Gin, K. (2017). Effects of benzophenone 3 on the green alga *Chlamydomonas reinhardtii* and the cyanobacterium *Microcystis aeruginosa*. *Aquatic toxicology*, 193, 1-8. doi:10.1016/j.aquatox.2017.09.029
- Matamoros, V., Gutiérrez, 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*, 288:34-42. doi:10.1016/j.jhazmat.2015.02.002
- Mitchellmore, C., He, K., Gonsior, M., Hain, E., Heyes, A., Clark, C., . . . Blaney, L. (2019). Occurrence and distribution of UV-filters and other anthropogenic contaminants in coastal surface water, sediment and coral tissue from Hawaii. *Science of the total environment*, 670, 398-410. doi:10.1016/j.scitotenv.2019.03.034
- Molina, J. (2018). *Pantallas Solares (Tesis de Licenciatura)*. San Cristobal de la Laguna, España: Facultad de Farmacia, Universidad de la Laguna.
- Nanduca, H. (2015). Utilización de aguamiel de café y melaza en agua residual sintética en el cultivo de la microalga *Scenedesmus sp.* para la producción de lípidos (Tesis de maestría). Yucatán, México. Centro de Investigación Científica de Yucatán A.C.
- National Center for Biotechnology Information. (2024). *PubChem Compound Summary for CID 4632, Oxybenzone*. Retrieved from <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Oxybenzone>
- Ouchene, L., Litvinov, I., & Netchiporouk, E. (2019). Hawaii and Other Jurisdictions Ban Oxybenzone or Octinoxate Sunscreens Based on the Confirmed Adverse Environmental Effects of Sunscreen Ingredients on Aquatic Environments. *Journal of Cutaneous Medicine and Surgery*, 23(6), 648-649. doi:10.1177/1203475419871592
- Pacheco, D., Rocha, A. C., Pereira, L., & Verdelhos, T. (2020). Microalgae Water Remediation: Trends and Hot Topics. *Applied Sciences*, 10(5), 1886. doi:10.3390/app10051886
- Ramos, S., Homem, V., Alves, A., & Santos, L. (2015). Advances in analytical methods and occurrence of organic UV-filters in the environment-A review.

- Science of the total environment*, 526, 278-311. doi:10.1016/j.scitotenv.2015.04.055
- Rodil, R., Moeder, M., Altenburger, R., & Schmitt-Jansen, M. (2009). Photostability and phytotoxicity of selected sunscreen agents and their degradation mixtures in water. *Analytical and bioanalytical chemistry*, 395, 1513-1524. doi:10.1007/s00216-009-3113-1
- Rodríguez, C., González, P., Diéguez, M., & Flores, A. (2022). Impacto de los filtros ultravioleta en el entorno natural. *Actas dermo-sifiliográficas*, 113(8), 792-803. doi:10.1016/j.ad.2022.03.010
- Sánchez Prado, L. (2007). Estudio de la fotodegradación de compuestos orgánicos mediante microextracción en fase sólida, cromatografía de gases y espectrometría de masas (Tesis de Doctorado). *Santiago de Compostela, España. Facultad de Química, Universidad de Santiago de Compostela*.
- Sánchez, D. (2021). Influencia de la deficiencia de nutrientes (C,N,P) en la remoción de diclofenaco por las microalgas *Chlorella vulgaris*, *Nannocloropsis oculata*, *Scenedesmus acutus*, *Scenedesmus obliquus* y *Chlamydomonas reinhardtii* CC137 y CC1731 (Tesis de Doctorado). San Luis Potosí: Universidad Autónoma de San Luis Potosí, Facultad de ciencias químicas.
- Sandoval, J., Morales-Granados, M., & Rubio, D. (2020). Breve revisión del uso de microalgas para la remoción. *Gestión y Ambiente*, 23(1), 127-137. doi:10.15446/ga.v23n1.84034
- Schneider, S., & Lim, H. (2019, Jan). Review of environmental effects of oxybenzone and other sunscreen active ingredients. *Journal of the american academy of dermatology*, 80(1), 266-271. doi:10.1016/j.jaad.2018.06.033.
- Solis, C. (2018). Aplicación de *Chlorella vulgaris* en agua residual para su reuso (Tesis de Maestría). *Puebla, México. Posgrado en Ciencias Ambientales, Benemérita Universidad Autónoma de Puebla*.
- Sousa, C., Sousa, E., Vale, F., & Simoes, M. (2021). Microalgae-based bioremediation of wastewaters- Influencing parameters and mathematical growth modelling. *Chemical Engineering Journal*, 425(131412), 1-11. doi:doi.org/10.1016/j.cej.2021.131412.
- Walton, T. (2018). Inhibition grow effect of sunscreen UV filters on the freshwater microalga *Scenedesmus acutus*. *Advancing Oklahoma Scholarship, Research and Institutional Memory*, 1-10, *Oklahoma State University*.

ANEXOS

Anexo 1. Cuantificación de clorofila a para *C. vulgaris* y *S. acutus* en presencia de 5 mg/L de oxibenzona. Se muestran los resultados de la cuantificación de clorofila en las muestras control (C) y en presencia de 5 mg/L de oxibenzona (BP3).

Cuantificación de clorofila a			
Tiempo (h)	Muestra	<i>Chlorella vulgaris</i> (mg/L)	<i>Scenedesmus acutus</i> (mg/L)
24	C	5.584	7.550
48	C	8.427	11.998
72	C	8.647	12.284
96	C	10.635	14.320
24	BP3	4.141	8.033
48	BP3	6.200	10.158
72	BP3	7.566	12.567
96	BP3	10.787	10.301

Anexo 2. Evaluación de la capacidad de remoción de oxibenzona y homosalato por *C. vulgaris* en medio Bold basal. Se observa una disminución significativa de la concentración de oxibenzona al paso del tiempo en las muestras control CT1 y CT2, así como en las muestras en contacto con la biomasa T1 y T2.

<i>Chlorella vulgaris</i>						
Muestra	Tiempo (h)	Concentración inicial (mg/L)	Oxibenzona			Homosalato
			Área bajo la curva (mUA/s)	Concentración final (mg/L)	% de reducción	Área bajo la curva (mUA/s)
*CT1	24	1	52.8	0.15	84.56	18.9
CT1	24	5	68.8	0.20	95.99	373
CT1	24	10	25.6	0.08	99.24	-
**T1	24	1	63.1	0.18	81.59	-
T1	24	5	50	0.15	97.07	-
T1	24	10	394.3	1.14	88.61	-
CT2	48	1	18.1	0.05	94.56	-
CT2	48	5	53.3	0.16	96.88	-
CT2	48	10	157.8	0.46	95.43	-
T2	48	1	29.9	0.09	91.16	-
T2	48	5	24.4	0.07	98.55	-
T2	48	10	79.2	0.23	97.70	-

*CT: Control sin biomasa.

**T: Ensayo con biomasa.

Anexo 3. Evaluación de la capacidad de remoción de oxibenzona por *S. acutus* en medio TAP. Se observa una disminución de la concentración de oxibenzona al paso del tiempo en las muestras control y en contacto con la biomasa.

<i>Scenedesmus acutus</i>					
Muestra	Tiempo (h)	Concentración (mg/L)	Área bajo la curva (mUA/s)	Concentración final (mg/L)	% de reducción
*CT1 1	24	5	285	1.09	78.11
CT1 2	24	5	402	1.54	69.19
CT1 1	24	10	424	1.62	83.76
CT1 2	24	10	340	1.30	86.96
**T1 1	24	5	146	0.56	88.71
T1 2	24	5	591	2.26	54.79
T1 1	24	10	189	0.73	92.71
T1 2	24	10	817	3.12	68.78
CT2 1	48	5	81.3	0.32	93.64
CT2 2	48	5	44	0.18	96.48
CT2 1	48	10	83.1	0.32	96.75
CT2 2	48	10	52.9	0.21	97.90
T2 1	48	5	11.4	0.05	98.97
T2 2	48	5	8.3	0.04	99.20
T2 1	48	10	181.5	0.70	93.00
T2 2	48	10	21.4	0.09	99.10
CT3 1	72	5	62.7	0.25	95.06
CT3 2	72	5	60.8	0.24	95.20
CT3 1	72	10	65.1	0.26	97.44
CT3 2	72	10	52.2	0.21	97.93
T3 1	72	5	10.3	0.05	99.05
T3 2	72	5	9.3	0.04	99.13
T3 1	72	10	21.2	0.09	99.11
T3 2	72	10	31.3	0.13	98.72
CT4 1	96	5	68.8	0.27	94.59
CT4 2	96	5	50.9	0.20	95.96
CT4 1	96	10	54.1	0.21	97.86
CT4 2	96	10	42.4	0.17	98.30
T4 1	96	5	20.2	0.09	98.30
T4 2	96	5	18.5	0.08	98.42
T4 1	96	10	46.1	0.18	98.16
T4 2	96	10	72.9	0.29	97.14

*CT: Control sin biomasa

**T: Ensayo con biomasa

Anexo 4. Evaluación de la capacidad de remoción de oxibenzona por *S. acutus* en medio TAP cada 12 h. Se observa una disminución significativa de la concentración de oxibenzona al paso del tiempo en las muestras control, así como en las muestras en contacto con la biomasa.

<i>Scenedesmus acutus</i>					
Muestra	Tiempo (h)	Concentración inicial (mg/L)	Área bajo la curva (mUA/s)	Concentración final (mg/L)	% de reducción
*CT1	12	5	602.2	2.30	53.93
CT2	24	5	452.2	1.73	65.37
CT3	36	5	429.1	1.64	67.13
CT4	48	5	564.5	2.16	56.81
CT5	60	5	324.9	1.25	75.07
CT6	72	5	369	1.41	71.71
CT7	84	5	258	0.99	80.17
CT8	96	5	312.9	1.20	75.98
**T1	12	5	160.8	0.62	87.58
T2	24	5	59.7	0.24	95.29
T3	36	5	34.2	0.14	97.23
T4	48	5	46.9	0.19	96.26
T5	60	5	15.9	0.07	98.63
T6	72	5	18.7	0.08	98.41
T7	84	5	0	0.01	99.84
T8	96	5	0	0.01	99.84

*CT: Control sin biomasa

**T: Ensayo con biomasa

Anexo 5. Evaluación de la capacidad de remoción de oxibenzona por *C. vulgaris* en medio TAP cada 12 h. Se observa una disminución significativa de la concentración de oxibenzona al paso del tiempo en las muestras control, así como en las muestras en contacto con la biomasa.

<i>Chlorella vulgaris</i>					
Muestra	Tiempo (h)	Concentración inicial (mg/L)	Área bajo la curva (mUA/s)	Concentración final (mg/L)	% de reducción
*CT1	12	5	682	2.61	47.85
CT2	24	5	490.3	1.88	62.46
CT3	36	5	454.4	1.74	65.20
CT4	48	5	383.7	1.47	70.59
CT5	60	5	360.3	1.38	72.37
CT6	72	5	246	0.95	81.08
CT7	84	5	159	0.61	87.72
CT8	96	5	152	0.59	88.25
**T1	12	5	384.015	1.47	70.56
T2	24	5	146.05	0.56	88.70
T3	36	5	165.35	0.64	87.23
T4	48	5	86.325	0.34	93.26
T5	60	5	78.75	0.31	93.83
T6	72	5	12.05	0.05	98.92
T7	84	5	13.725	0.06	98.79
T8	96	5	14.8	0.06	98.71

*CT: Control sin biomasa

**T: Ensayo con biomasa

10. GLOSARIO

Abiótico: Que carece de seres vivos

Auxótrofo; Microorganismo que carece de la capacidad para producir nutrientes específicos que permitan su proliferación.

Bioacumulación: Incremento de la concentración de sustancias exógenas en los organismos vivos mayores a las presentes en el medio naturalmente.

Cenobio: Agrupación de células de algas o protozoarios de común origen y número fijo que proceden de la bipartición de una célula inicial.

Contaminante: Sustancias exógenas presentes en el medio ambiente y que pueden causar efectos adversos.

Disrupción endócrina: Modificación de la homeóstasis hormonal en los seres vivos que puede causar efectos adversos.

Espectrofotometría: Técnica analítica utilizada para medir la cantidad de luz que absorbe una sustancia, 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

Filtro UV: Revestimiento especial que absorbe o refleja la radiación ultravioleta

Fotólisis: Ruptura o descomposición de enlaces químicos por efecto de la luz y/o radiación.

Hermafroditismo: Todo organismo que presenta órganos reproductivos femeninos y masculinos.

Heterótrofo: Dicho de un organismo: Incapaz de elaborar su propia materia orgánica a partir de sustancias inorgánicas, por lo que debe nutrirse de otros seres vivos.

Hidrofílico: Sustancia que tiene afinidad por el agua.

Hidrofóbico: Sustancia que tiene afinidad a moléculas no polares y/o repelen el agua.

Lipofilicidad: Que presenta afinidad por las grasas.

Mixotrófico: Organismos vivos capaces de obtener energía metabólica tanto de seres vivos como de la fotosíntesis.

Xenobiótico: Sustancia que no se encuentra o produce de forma natural en el organismo.