



# Universidad Autónoma de San Luis Potosí

---

---

Facultad de Ciencias Químicas  
Programa de Posgrado en Ciencias Químicas

“Influencia de la deficiencia de nutrientes (C, N, P)  
en la remoción de diclofenaco por las microalgas  
*Chlorella vulgaris*, *Nannochloropsis oculata*,  
*Scenedesmus acutus*, *Scenedesmus obliquus*,  
*Chlamydomonas reinhardtii* CC137 y CC1731”

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

Presenta

M. T. A. Danaé Samara Sánchez Sandoval

Director de Tesis:

Dra. Ruth Elena Soria Guerra

Co-director:

Dr. Ramón Fernando García de la Cruz



San Luis Potosí, S. L. P. México

Junio de 2021

Proyecto realizado en:

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

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

Número de registro de la beca otorgada por CONACyT: 252858



Influencia de la deficiencia de nutrientes (C, N, P) en la remoción de diclofenaco por las microalgas *Chlorella vulgaris*, *Nannochloropsis oculata*, *Scenedesmus acutus*, *Scenedesmus obliquus*, *Chlamydomonas reinhardtii* CC137 y CC1731 por Danaé Samara Sánchez Sandoval se distribuye bajo una [Licencia Creative Commons Atribución-NoComercial 4.0 Internacional](https://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/).



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



"Influencia de la deficiencia de nutrientes (C, N, P)  
en la remoción de diclofenaco por las microalgas *Chlorella vulgaris*,  
*Nannochloropsis oculata*, *Scenedesmus acutus*, *Scenedesmus obliquus*,  
*Chlamydomonas reinhardtii* CC137 y CC1731"

TESIS QUE PARA OBTENER EL GRADO DE:  
DOCTOR EN CIENCIAS QUÍMICAS

PRESENTA

M. T. A. DANAÉ SAMARA SÁNCHEZ SANDOVAL

SINODALES

DRA. RUTH ELENA SORIA GUERRA

DR. RAMÓN FERNANDO GARCÍA DE LA CRUZ.

DRA. MA. CATALINA ALFARO DE LA TORRE

DR. OMAR GONZÁLEZ ORTEGA

DR. JOSÉ FRANCISCO MORALES DOMÍNGUEZ

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

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

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

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

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

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

## Agradecimientos

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Eleanor Roosevelt

## DEDICATORIAS

A Dios:

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

A mi hija **Ketziah Giovanna**:

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

**Te amo mi hermosa Princesa.**

A mi esposo Adrián:

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

A mis papas y hermanos:

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

A mis amigos:

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

## RESUMEN

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

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

## ABSTRACT

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

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

## ÍNDICE DE CONTENIDO

CAPITULO I .....	1
1. INTRODUCCIÓN.....	1
1.1. CONTAMINANTES EMERGENTES.....	2
1.1.1. Diclofenaco (DCF) .....	6
1.2. TRATAMIENTOS PARA LA ELIMINACIÓN DE CONTAMINANTES EMERGENTES .....	8
1.3. FICORREMEDIACIÓN .....	11
1.4. MICROALGAS.....	12
1.4.1. Cultivo de microalgas .....	13
1.4.1.1. Nutrientes y su función.....	13
1.4.1.2. pH.....	15
1.4.1.3. Temperatura.....	16
1.4.1.4. Luz y agitación .....	16
1.4.2. Mecanismos de remoción de sustancias atribuidos a las microalgas .....	17
1.4.3. Material biológico.....	20
1.4.3.1. <i>Chlorella vulgaris</i> .....	20
1.4.3.2. <i>Nannochloropsis oculata</i> .....	21
1.4.3.3. <i>Scenedesmus acutus y obliquus</i> .....	22
1.4.3.4. <i>Chlamydomonas reinhardtii</i> .....	23
1.5. ANTECEDENTES .....	25
CAPITULO II.....	27
2.1. JUSTIFICACIÓN .....	27
2.2. HIPÓTESIS .....	28
2.3. OBJETIVO GENERAL .....	28
2.3.1. Objetivos específicos.....	28
CAPITULO III.....	29
3. METODOLOGÍA.....	29
3.1. CULTIVO DE MICROALGAS .....	30
3.2. DISEÑO EXPERIMENTAL .....	32

3.3. PROPAGACIÓN DE LAS MICROALGAS A DIFERENTES CONCENTRACIONES DE NITRÓGENO, FÓSFORO Y CARBONO. ....	34
3.4. PREPARACIÓN DE SOLUCIONES STOCK DE DICLOFENACO .....	35
3.5. EVALUACIÓN DEL EFECTO DEL DICLOFENACO EN EL CRECIMIENTO DE LAS MICROALGAS .....	35
3.6. CINÉTICAS DE CRECIMIENTO Y CUANTIFICACIÓN DE CLOROFILA A .....	36
3.7. ANÁLISIS POR HPLC PARA EVALUAR LA REMOCIÓN DE FÁRMACOS .....	38
3.8. DETERMINACIÓN DEL MECANISMO DE REMOCIÓN .....	39
3.8.1. Desorción de la pared celular .....	39
3.9. DEGRADACION DEL DICLOFENACO POR FOTÓLISIS .....	40
3.10. ANÁLISIS ESTADÍSTICO .....	40
CAPITULO IV .....	42
4.1. RESULTADOS Y DISCUSIÓN .....	42
4.1.1. Efecto de diclofenaco en el crecimiento de microalgas .....	42
4.1.2. Efecto de la composición del medio de cultivo sobre el crecimiento de las microalgas por medio de la cuantificación de <i>clorofila a</i> .....	49
4.1.3. Cuantificación de diclofenaco removido del medio de cultivo durante el desarrollo de las microalgas.....	65
4.1.4. Proceso de remoción de diclofenaco por adsorción a la pared celular .....	69
4.1.5. Fotodegradación de diclofenaco .....	75
CAPITULO V.....	78
5.1. CONCLUSIONES.....	78
CAPITULO VI .....	80
6.1. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS.....	80
APÉNDICE A .....	104
A.1. EFECTO DE LA COMPOSICIÓN DEL MEDIO DE CULTIVO SOBRE EL CRECIMIENTO DE LAS MICROALGAS POR MEDIO DE LA DENSIDAD ÓPTICA.....	104
GLOSARIO .....	116

## **ÍNDICE DE FIGURAS**

<b>Figura 1.</b> Contaminación de aguas residuales por productos farmacéuticos .....	4
<b>Figura 2.</b> Estructura química del diclofenaco .....	7
<b>Figura 3.</b> <i>Chlorella vulgaris</i> .....	21
<b>Figura 4.</b> <i>Nannochloropsis oculata</i> .....	22
<b>Figura 5.</b> Especies del género <i>Scenedesmus</i> .....	23
<b>Figura 6.</b> <i>Chlamydomonas reinhardtii</i> .....	25
<b>Figura 7.</b> Diagrama de flujo de la metodología para la remoción de diclofenaco por 6 diferentes cepas de microalgas .....	29
<b>Figura 8.</b> Sistema de cultivo de microalgas.....	33
<b>Figura 9.</b> Cinética de crecimiento en ausencia y presencia de diferentes concentraciones de diclofenaco (5 - 30 $\mu\text{g mL}^{-1}$ ): a) <i>C. vulgaris</i> y b) <i>N. oculata</i> .....	43
<b>Figura 10.</b> Cinética de crecimiento en ausencia y presencia de diferentes concentraciones de diclofenaco (4.4 – 26.3 $\mu\text{g mL}^{-1}$ ): a) <i>S. acutus</i> b) <i>S. obliquus</i> .....	44
<b>Figura 11.</b> Cinética de crecimiento en ausencia y presencia de diferentes concentraciones de diclofenaco (2.5 – 15 $\mu\text{g mL}^{-1}$ ): a) <i>C. reinhardtii</i> CC137 y b) <i>C. reinhardtii</i> CC1731.....	46
<b>Figura 12.</b> Efecto de C, N y P en el medio de cultivo en presencia y ausencia de diclofenaco (10 $\mu\text{g mL}^{-1}$ ) en <i>C. vulgaris</i> .....	51
<b>Figura 13.</b> Efecto de C, N y P en el medio de cultivo en presencia y ausencia de diclofenaco (10 $\mu\text{g mL}^{-1}$ ) en <i>N. oculata</i> .....	53
<b>Figura 14.</b> Efecto de C, N y P en el medio de cultivo en presencia y ausencia de diclofenaco (8.7 $\mu\text{g mL}^{-1}$ ) en <i>S. acutus</i> .....	55
<b>Figura 15.</b> Efecto de C, N y P en el medio de cultivo en presencia y ausencia de diclofenaco (8.7 $\mu\text{g mL}^{-1}$ ) en <i>S. obliquus</i> .....	57
<b>Figura 16.</b> Efecto de C, N y P en el medio de cultivo en presencia y ausencia de diclofenaco (5 $\mu\text{g mL}^{-1}$ ) en <i>C. reinhardtii</i> CC137 .....	63
<b>Figura 17.</b> Efecto de C, N y P en el medio de cultivo en presencia y ausencia de diclofenaco (5 $\mu\text{g mL}^{-1}$ ) en <i>C. reinhardtii</i> CC1731 .....	64
<b>Figura 18.</b> Efecto de NaCl 1M y Tween-20 al 0.1% en la desorción de diclofenaco de las microalgas <i>C. vulgaris</i> , <i>N. oculata</i> , <i>S. acutus</i> y <i>S. obliquus</i> .....	70
<b>Figura 19.</b> Efecto de NaCl 1M y Tween-20 al 0.1% en la desorción de diclofenaco de las microalgas a) <i>C. reinhardtii</i> CC137 y b) <i>C. reinhardtii</i> CC1731 .....	71
<b>Figura 20.</b> Fotodegradación de diclofenaco .....	75
<b>Figura A 1.</b> Cinética de crecimiento de <i>C. vulgaris</i> .....	105
<b>Figura A 2.</b> Cinética de crecimiento de <i>N. oculata</i> .....	107
<b>Figura A 3.</b> Cinética de crecimiento de <i>S. acutus</i> .....	109
<b>Figura A 4.</b> Cinética de crecimiento de <i>S. obliquus</i> .....	111

<b>Figura A 5.</b> Cinética de crecimiento de <i>C. reinhardtii</i> CC137.....	113
<b>Figura A 6.</b> Cinética de crecimiento de <i>C. reinhardtii</i> CC1731 .....	114

## **INDICE DE TABLAS**

<b>Tabla 1.</b> Presencia de productos farmacéuticos en organismos acuáticos.....	5
<b>Tabla 2.</b> Propiedades del diclofenaco.....	7
<b>Tabla 3.</b> Remoción de antiinflamatorios no esteroideos por diferentes tratamientos .....	10
<b>Tabla 4.</b> Composición de la solución nutritiva TAP (Tris-Acetato-Fosfato) .....	30
<b>Tabla 5.</b> Composición de la solución nutritiva Bold .....	31
<b>Tabla 6.</b> Concentración de los nutrientes (C, N, P) en los medios de cultivo sin modificar ....	32
<b>Tabla 7.</b> Diseño experimental de las diferentes concentraciones expresadas en porcentaje para cada nutriente .....	32
<b>Tabla 8.</b> Diseño experimental completo de las diferentes concentraciones de cada nutriente (C, N, P) por microalga para <i>C. vulgaris</i> , <i>N. oculata</i> , <i>S. acutus</i> y <i>S. obliquus</i> .....	33
<b>Tabla 9.</b> Concentraciones establecidas de diclofenaco para evaluar su efecto en el crecimiento de las microalgas.....	36
<b>Tabla 10.</b> Concentraciones de diclofenaco para evaluar su remoción por cada microalga....	48
<b>Tabla 11.</b> Porcentaje de remoción de diclofenaco por las microalgas <i>C. vulgaris</i> , <i>N. oculata</i> , <i>S. acutus</i> y <i>S. obliquus</i> con diferentes concentraciones de nitrógeno, fósforo y carbono.....	66
<b>Tabla 12.</b> Porcentaje de remoción de diclofenaco por las microalgas <i>C. reinhardtii</i> CC137 y <i>C. reinhardtii</i> CC1731 con diferentes concentraciones de carbono, nitrógeno y fósforo.....	68

## CAPITULO I

### 1. INTRODUCCIÓN

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

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

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

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

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

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

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

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

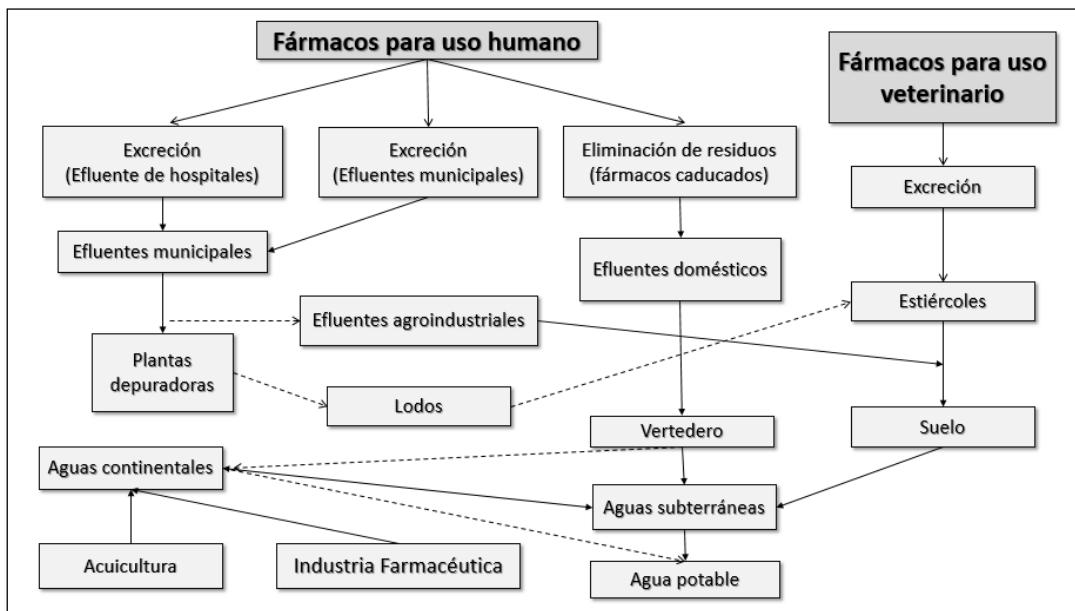
### **1.1. CONTAMINANTES EMERGENTES**

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

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

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

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



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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

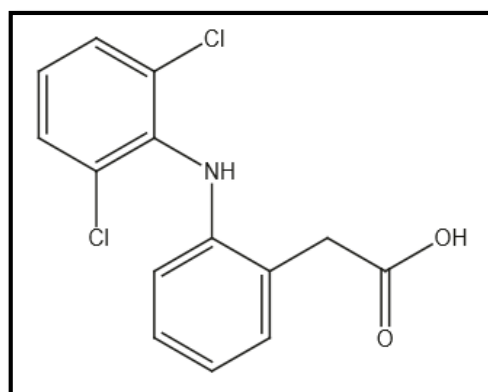
Tanto en países en desarrollo como industrializados se han detectado antiinflamatorios no esteroideos comercializados internacionalmente, donde el diclofenaco se detecta en el medio acuático de 50 países en el mundo, siendo el fármaco mayormente encontrado (IWW, 2014).

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

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

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

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



**Figura 2. Estructura química del diclofenaco**

**Tabla 2. Propiedades del diclofenaco.**

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

### 1.3. FICORREMIACIÓN

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

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

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

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

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

#### **1.4. MICROALGAS**

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

alta radiación y temperatura, así como en el caso de déficit de  $\text{CO}_2$ . Muchas especies de microalgas no son capaces de sobrevivir en un medio sobresaturado de oxígeno más de 2 o 3 h (para algunas el 120% de saturación en el aire, para otras el 200%). Además, la producción fotosintética de oxígeno en cultivos de alta densidad puede alcanzar hasta  $40 \text{ mg L}^{-1}$ , de modo que mediante la radiación adecuada pueden llegar a desarrollarse radicales de oxígeno. Los radicales libres serían tóxicos para las células y causarían daños en sus membranas. La presión parcial del oxígeno en el cultivo puede disminuirse mediante aumento de la turbulencia y burbujeo de aire (Ruiz, 2011).

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

#### **1.4.1.2. pH**

El pH de las microalgas tiene diversos requerimientos para su crecimiento, en condiciones alcalinas la disponibilidad de  $\text{CO}_2$  puede ser limitante para el crecimiento y la fotosíntesis. Los rangos de pH de crecimiento para las microalgas se encuentran entre 7 y 9, con un óptimo entre 8.2 y 8.7. El control de pH se consigue mediante aireación o adición de  $\text{CO}_2$ . Esto es debido a que el proceso fotosintético de fijación de  $\text{CO}_2$  provoca un aumento gradual de pH en el medio por la acumulación de  $\text{OH}^-$ . El aumento en el pH puede promover la eliminación de nitrógeno en forma de amoníaco por burbujeo a la atmósfera ya que la disociación de  $\text{NH}_4^+$  a  $\text{NH}_3$  se produce a partir de valores de pH superiores a 8. La forma de  $\text{NH}_4^+$  prevalece hasta valores de pH inferiores a 9.25, valores superiores a 9.25 ocasionan que el  $\text{NH}_3$  predomine sobre el  $\text{NH}_4^+$ , aumentando la velocidad de remoción del N a través de la volatilización de  $\text{NH}_3$ .

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

#### **1.4.1.3. Temperatura**

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

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

#### **1.4.1.4. Luz y agitación**

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

En particular, la degradación intracelular de fármacos consiste en dos fases. Los ataques iniciales comienzan con la enzima de fase I (citocromo P<sub>450</sub>) que produce un compuesto más hidrofílico al generar o exponer un grupo funcional (por ejemplo, un hidroxilo) dentro de una molécula. Lo anterior puede ocurrir a través de la introducción directa del grupo funcional (por ejemplo hidroxilación aromática y alifática) o modificando los grupos funcionales existentes (por ejemplo reducción de cetonas y aldehídos a alcoholes, oxidación de alcoholes a ácidos, hidrólisis de ésteres y amidas y reducción de compuestos nitro) (Parkinson y Ogilvie, 2008). Entre las principales reacciones enzimáticas reportadas durante la degradación de fármacos por microalgas se incluyen la hidroxilación, carboxilación, oxidación, hidrogenación, glucosilación, desmetilación, escisión del anillo, descarboxilación, deshidroxilación y bromación (Thies *et al.*, 1996; Maes *et al.*, 2014; Peng *et al.*, 2014; Matamoros *et al.*, 2015; Xiong *et al.* 2016; Ding *et al.*, 2017; Xiong, *et al.*, 2017).

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

### **1.4.3. Material biológico**

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

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

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

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

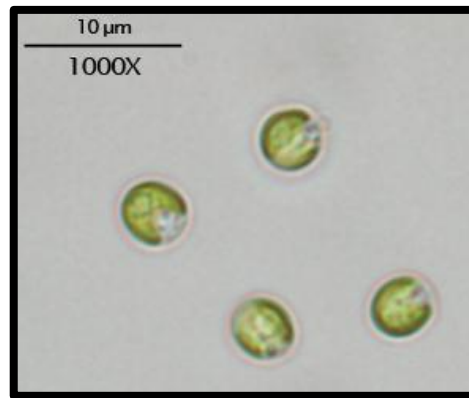


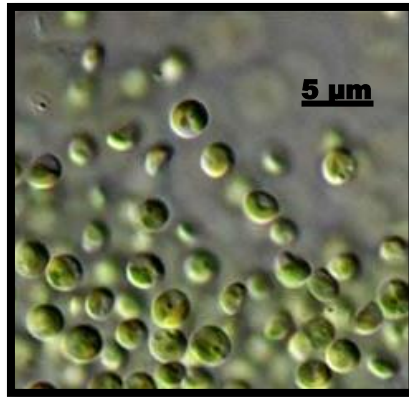
Figura 3. *Chlorella vulgaris* (UTEX, 2021).

#### 1.4.3.2. *Nannochloropsis oculata*

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

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

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



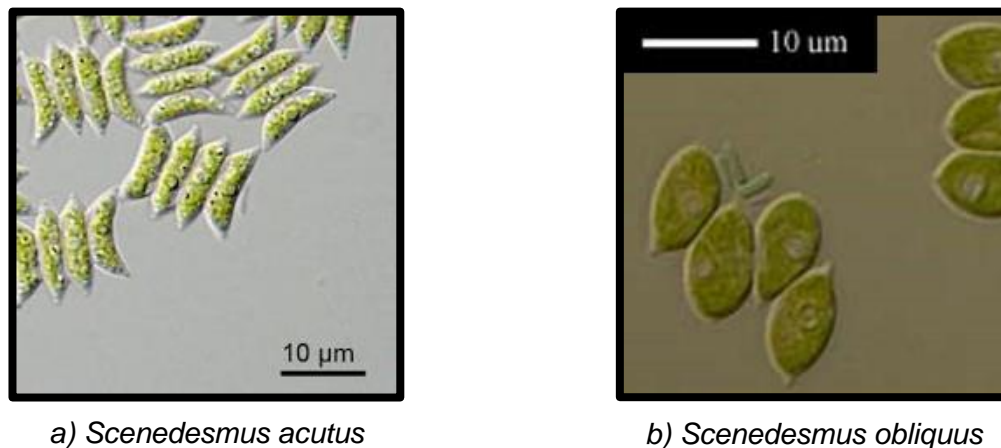
**Figura 4.** *Nannochloropsis oculata* (Baker, 2012).

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

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

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

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



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

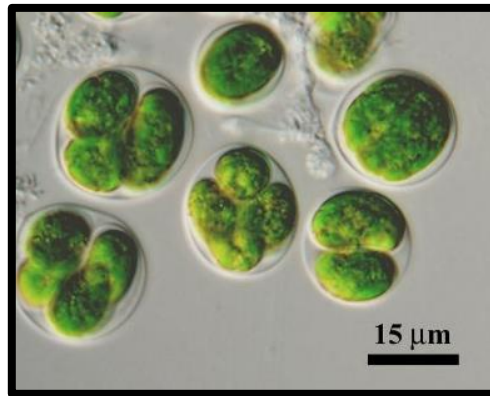
#### 1.4.3.4. *Chlamydomonas reinhardtii*

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

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

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

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



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

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

### **1.5. ANTECEDENTES**

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

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

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

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

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

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

## CAPITULO II

### 2.1. JUSTIFICACIÓN

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

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

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

## **2.2. HIPÓTESIS**

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

## **2.3. OBJETIVO GENERAL**

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

### **2.3.1. Objetivos específicos**

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

## CAPITULO III

### 3. METODOLOGÍA

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

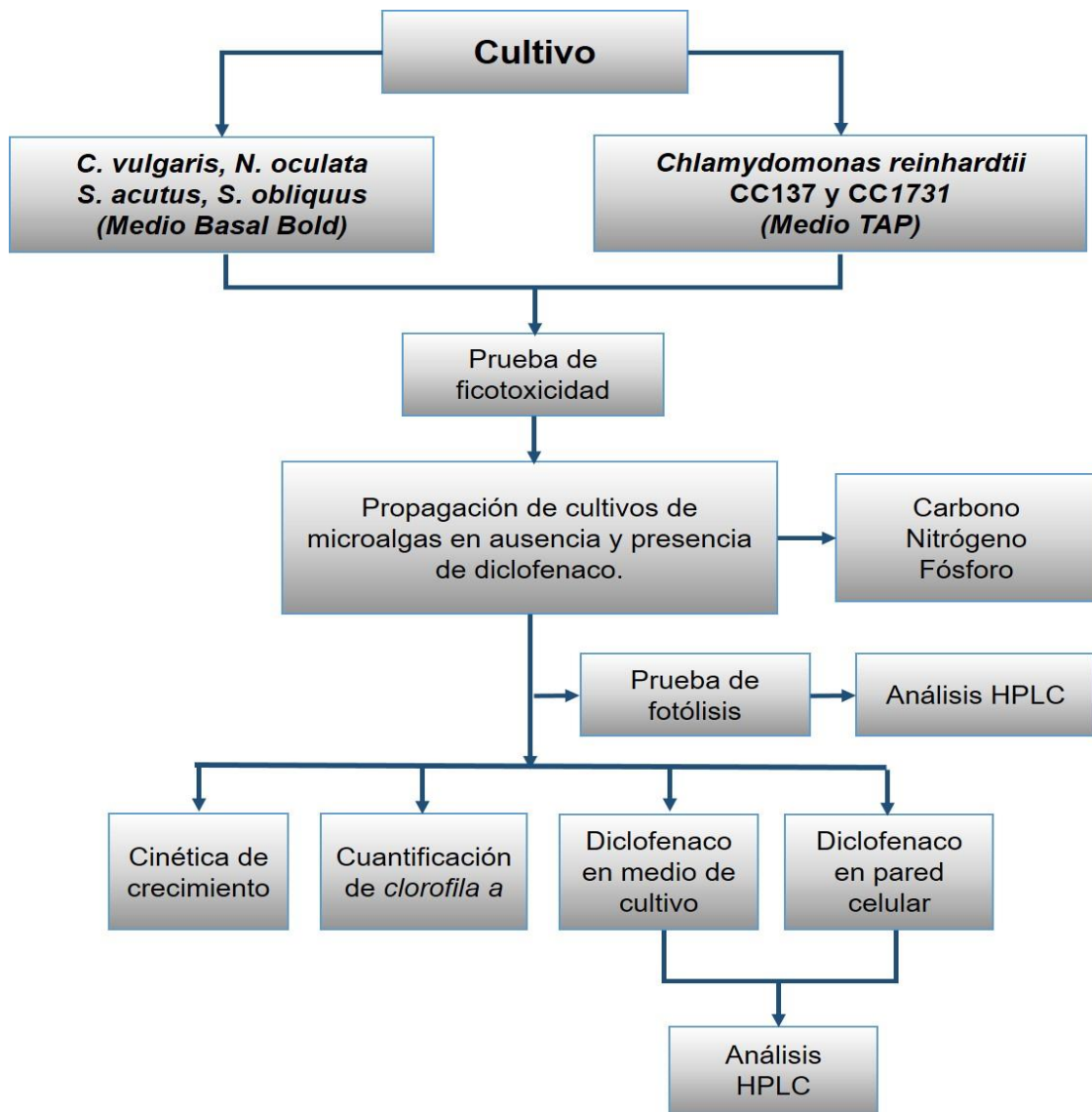


Figura 7. Diagrama de flujo de la metodología para la remoción de diclofenaco por 6 diferentes cepas de microalgas.

### 3.1. CULTIVO DE MICROALGAS

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

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

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

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

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

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

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

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

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

### 3.2. DISEÑO EXPERIMENTAL

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

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

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

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

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

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

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

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

	Experimento	Variabes	Niveles
Microalga	Sin fármaco	Carbono	50%
			100%
		Nitrógeno	50%
			100%
		Fósforo	50%
			100%
	Diclofenaco	Carbono	50%
			100%
		Nitrógeno	50%
			100%
		Fósforo	50%
			100%

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

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



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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

### **3.10. ANÁLISIS ESTADÍSTICO**

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

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

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

## CAPITULO IV

### 4.1. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

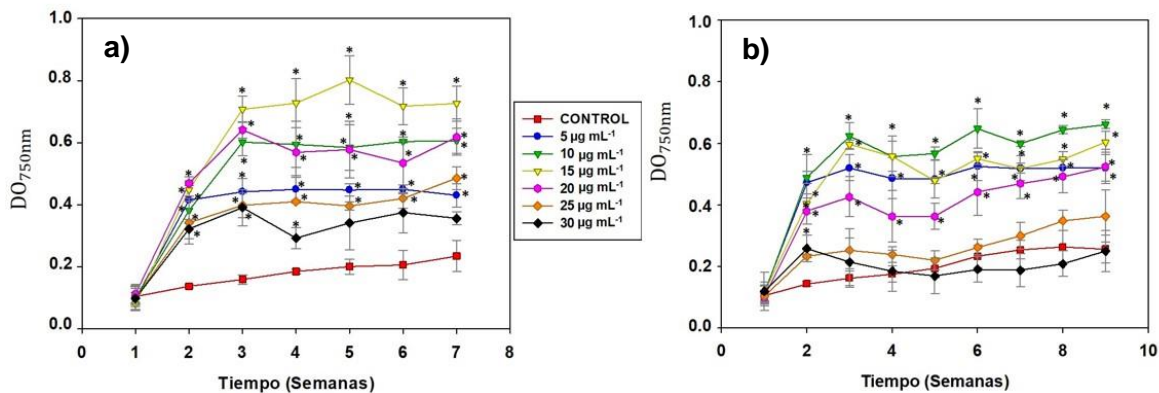
En este capítulo se describen los resultados correspondientes a las cinéticas de crecimiento de las 6 especies de microalgas en las diferentes concentraciones iniciales de nutrientes con diclofenaco y su respectivo control, así como también la remoción de diclofenaco por cada microalga y por la luz.

#### 4.1.1. Efecto de diclofenaco en el crecimiento de microalgas

En la primera etapa del proceso se determinó la capacidad de las microalgas *C. vulgaris*, *N. oculata*, *S. acutus*, *S. obliquus* y *C. reinhardtii* CC137 y CC1731 para desarrollarse en presencia de concentraciones variables de diclofenaco.

Se ajustó la OD<sub>750nm</sub> inicial de los cultivos a 0.1 y se mantuvieron en agitación continua sin aireación, con fotoperiodo de 16 h luz y 8 h oscuridad, hasta llegar a su fase estacionaria. Se tomó una alícuota de 1 mL de los cultivos cada 48 h para *C. reinhardtii* CC1731 y CC137 y para el resto de las cepas cada semana. En el caso de ambas cepas de *Chlamydomonas*, se tomó muestra cada 48 h debido a que el medio de cultivo (TAP) presentaba el 100% de sus nutrientes (C, N y P) por lo que contaba con el medio óptimo para su crecimiento; por el contrario, a las microalgas *C. vulgaris*, *N. oculata*, *S. acutus* y *S. obliquus* no se les proporcionó fuente de carbono (CO<sub>2</sub>), solo lo aportado por el fármaco, esto debido a que la finalidad de este análisis fue comprobar que las concentraciones evaluadas no presentaran efecto tóxico y seleccionar aquella concentración que promoviera un mayor crecimiento para cada microalga. Los datos obtenidos son el promedio de tres réplicas biológicas.

En la Figura 9 se observa las cinéticas de crecimiento de *C. vulgaris* (Figura 9a) y *N. oculata* (Figura 9b) en ausencia (control) y presencia de diferentes concentraciones de diclofenaco (5 - 30 µg mL<sup>-1</sup>).



**Figura 9. Cinética de crecimiento en ausencia y presencia de diferentes concentraciones de diclofenaco (5 - 30  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ): a) *C. vulgaris* y b) *N. oculata*.**

Diferencias significativas ( $p < 0.05$ ) en el crecimiento respecto al control se marcan con un asterisco (\*). Prueba de Fisher.

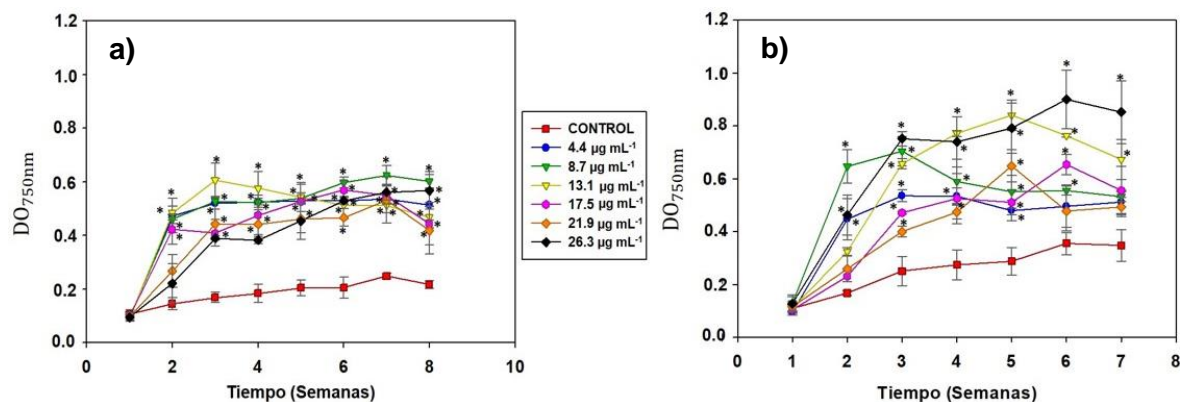
En la Figura 9a se observó que el diclofenaco estimula el crecimiento de los 6 cultivos a partir de la segunda semana para *C. vulgaris*. El cultivo expuesto a la concentración de  $15 \mu\text{g mL}^{-1}$  mostró el mayor crecimiento desde la semana 3, manteniéndose así hasta su fase de declive. Mientras que el cultivo con  $30 \mu\text{g mL}^{-1}$  de diclofenaco mostró el menor crecimiento, pero significativamente mayor que el control. A partir de la semana 7 todos los cultivos alcanzaron su fase estacionaria.

En la Figura 9b se observa la cinética de crecimiento de *N. oculata* donde los cultivos con 5, 10, 15 y  $20 \mu\text{g mL}^{-1}$  de concentración inicial de diclofenaco presentaron una estimulación en el crecimiento con respecto al control, esto se mantuvo hasta que los cultivos alcanzaron su fase estacionaria. El mayor crecimiento lo presentó el cultivo con  $10 \mu\text{g mL}^{-1}$  de diclofenaco. El cultivo con  $25 \mu\text{g mL}^{-1}$  de diclofenaco mostró un crecimiento similar al control; mientras que el cultivo con  $30 \mu\text{g mL}^{-1}$  mantuvo un menor crecimiento con respecto al control, sin embargo, la diferencia no fue significativa. A partir de la semana 9 los cultivos alcanzaron la fase estacionaria.

Se observó que para ambas microalgas las concentraciones de 5 a  $25 \mu\text{g mL}^{-1}$  estimulan significativamente su crecimiento, presentando *C. vulgaris* el mayor desarrollo. A la concentración de  $30 \mu\text{g mL}^{-1}$  el crecimiento no fue significativamente

diferente al control en el caso de *C. vulgaris*. Mientras que *N. oculata* tuvo un menor desarrollo de biomasa que el control. Zhang *et al.* (2019) reportaron que el diclofenaco en concentraciones de 60 a 150  $\mu\text{g mL}^{-1}$  causa una inhibición en el crecimiento de aproximadamente un 30% en *Chlorella pyrenoidosa* en medio SE, mientras que De Wilt *et al.* (2016) evaluaron la remoción de algunos fármacos en orina sintética y medio M8a, entre ellos el diclofenaco en un rango de concentración de 100 a 350  $\mu\text{g L}^{-1}$  sin observar alguna inhibición en el crecimiento de la microalga *Chlorella sorokiniana*. En nuestros resultados, se observó una disminución en el crecimiento de *C. vulgaris* a una concentración de 30  $\mu\text{g mL}^{-1}$  lo cual contrasta con lo mostrado en la literatura para microalgas del mismo género. Esto puede deberse a la diferencia de las especies, ya que la composición de los medios de cultivo usados en los trabajos reportados es similar al medio Bold, el cual fue el medio seleccionado en este trabajo. En cuanto al género de *Nannochloropsis*, no se encuentra reportado en la literatura el efecto del diclofenaco sobre ella.

En la Figura 10 se observa las cinéticas de crecimiento de *S. acutus* (Figura 10a) y *S. obliquus* (Figura 10b) en ausencia (control) y presencia de diferentes concentraciones de diclofenaco (4.4 – 26.3  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ).



**Figura 10. Cinética de crecimiento en ausencia y presencia de diferentes concentraciones de diclofenaco (4.4 – 26.3  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ): a) *S. acutus* b) *S. obliquus*.**

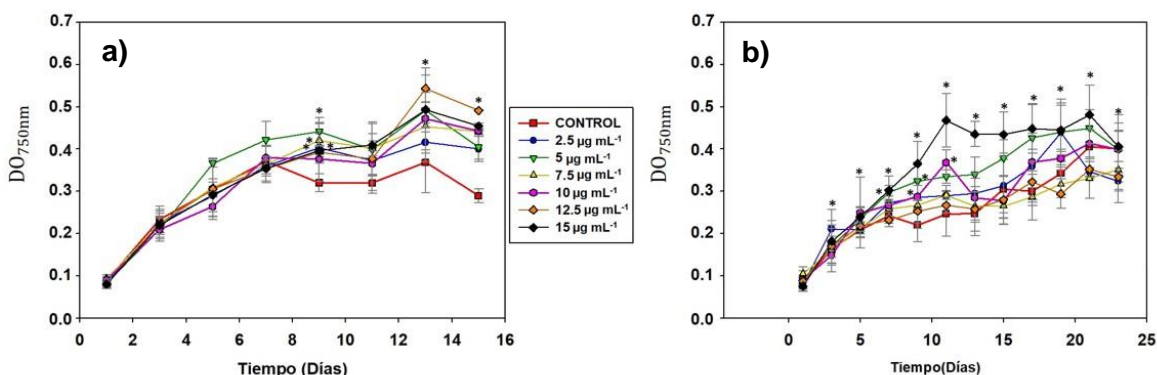
Diferencias significativas ( $p < 0.05$ ) en el crecimiento respecto al control se marcan con un asterisco (\*). Prueba de Fisher.

En la Figura 10a se observa que el diclofenaco en todas las concentraciones estimula el desarrollo de la microalga *S. acutus*. En la semana 7 se observó el mayor crecimiento en el cultivo con  $8.7 \mu\text{g mL}^{-1}$  de diclofenaco. Mientras que el cultivo con  $26.3 \mu\text{g mL}^{-1}$  mantuvo un crecimiento ligeramente menor hasta la semana 6, donde su crecimiento no fue significativamente diferente al control. A partir de la semana 8 se alcanzó la fase estacionaria en todos los cultivos.

En el caso de *S. obliquus* (Figura 10b), al igual que en *S. acutus*, los cultivos expuestos a las diferentes concentraciones de diclofenaco presentaron un mayor crecimiento con respecto al control. Las concentraciones de diclofenaco a las que las microalgas mostraron el mayor crecimiento fueron  $13.1$  y  $26.3 \mu\text{g mL}^{-1}$ . La séptima semana se dio por concluida la cinética de desarrollo ya que todos los cultivos habían alcanzado la fase estacionaria.

El comportamiento similar entre estas microalgas puede deberse a que pertenecen al mismo género; sin embargo, *S. obliquus* mostró un mayor crecimiento en comparación con *S. acutus*. Schmitt-Jansen *et al.* (2007), evaluaron la fitotoxicidad del diclofenaco a una concentración de  $50 \mu\text{g mL}^{-1}$  en *Scenedesmus vacuolatus*, sin encontrar inhibición en el crecimiento de esta microalga; esto concuerda con los resultados obtenidos donde ninguna de las concentraciones evaluadas afectaron el crecimiento de las microalgas analizadas. En contraste con nuestros resultados, Zhu *et al.* (2014), determinaron una inhibición en el crecimiento de *S. obliquus* a concentraciones de  $5$  a  $10 \mu\text{g mL}^{-1}$  en 7 días de exposición al diclofenaco. Al ser de la misma cepa (*S. obliquus*), la diferencia puede deberse a factores como la composición del medio o la condiciones de cultivo ya que se ha reportado que bajo condiciones diferentes del cultivo (temperatura o intensidad lumínica), las especies del género *Scenedesmus sp.* cambian su forma y tamaño, buscando una manera de adaptarse (Soplín, 2015).

En la Figura 11 se observan las cinéticas de crecimiento de *C. reinhardtii* CC137 (Figura 11a) y *C. reinhardtii* CC1731 (Figura 11b) en ausencia (control) y presencia de diferentes concentraciones de diclofenaco ( $2.5 - 15 \mu\text{g mL}^{-1}$ ).



**Figura 11. Cinética de crecimiento en ausencia y presencia de diferentes concentraciones de diclofenaco ( $2.5 - 15 \mu\text{g mL}^{-1}$ ): a) *C. reinhardtii* CC137 y b) *C. reinhardtii* CC1731.** Diferencias significativas ( $p < 0.05$ ) en el crecimiento respecto al control se marcan con un asterisco (\*). Prueba de Fisher.

En la Figura 11a se observa la cinética de crecimiento de *C. reinhardtii* CC137, los cultivos desarrollados en presencia de diferentes concentraciones de diclofenaco presentan un comportamiento en el crecimiento similar al cultivo control. El cultivo con  $5 \mu\text{g mL}^{-1}$  mantuvo el mayor crecimiento hasta el día 11, donde se presentó un crecimiento diaúxico en todos los cultivos retomando el crecimiento el día 13. Se observó un crecimiento significativamente mayor al del cultivo con  $15 \mu\text{g mL}^{-1}$  de diclofenaco con respecto a los demás cultivos, por lo que una mayor concentración del fármaco ayuda a obtener un mayor crecimiento. Se tomaron muestras hasta el día 15, tiempo en el que los cultivos alcanzan la fase estacionaria.

En el caso de *C. reinhardtii* CC1731 (Figura 11b) se observa que los cultivos con diclofenaco mantienen un crecimiento similar al cultivo control, donde a partir del día 9 el cultivo con  $15 \mu\text{g mL}^{-1}$  de diclofenaco mostró un crecimiento significativamente mayor en comparación con los demás cultivos incluyendo el control. A partir del día

15, se observa que los cultivos con 7.5 y 12.5  $\mu\text{g mL}^{-1}$  de diclofenaco presentaron un crecimiento menor que el control, pero sin ser esta diferencia significativamente diferente.

Las diferencias observadas en el crecimiento de estas microalgas puede deberse a que *C. reinhardtii* CC137 consta de pared celular que actúa como una barrera ya que está constituida por polímeros complejos con diversos grupos funcionales, los cuales podrían interaccionar con el diclofenaco reteniendo una fracción del fármaco, de tal forma que se reduce la concentración que podría ser internalizada; mientras que *C. reinhardtii* CC1731 carece de pared celular, por lo tanto, al presentan diferentes compuestos como lípidos que pueden facilitar el transporte del fármaco al crear un ambiente hidrofóbico y proteínas que interaccionan con el fármaco, facilitando la difusión del diclofenaco por la membrana celular. Según lo reportado por Majewska *et al.* (2018), el diclofenaco a una concentración de 134  $\mu\text{g mL}^{-1}$  provoca una inhibición del 50% en el crecimiento de *C. reinhardtii*, esto podría explicar el hecho de que, en este trabajo, el diclofenaco no haya provocado una disminución significativa en el crecimiento de las microalgas en los cultivos con respecto al cultivo control.

Se observó que en las 6 microalgas se estimuló el crecimiento en prácticamente todas las concentraciones de diclofenaco analizadas, excepto en *N. oculata* a la concentración de 30  $\mu\text{g mL}^{-1}$  y en *C. reinhardtii* CC1731 a las concentraciones de 7.5 y 12.5  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ; sin embargo, este crecimiento no fue significativamente diferente con respecto al cultivo control. Diversos estudios han evaluado la toxicidad del diclofenaco en concentraciones que van de 2  $\mu\text{g mL}^{-1}$  a 150  $\mu\text{g mL}^{-1}$ , usando diferentes especies de microalgas como *Desmodesmus subspicatus*, *Chlorella sorokiniana* y *Chlorella pyrenoidosa*. Los autores observaron que la inhibición del crecimiento solo se observaba a concentraciones superiores a 40  $\mu\text{g mL}^{-1}$ , mientras que a concentraciones inferiores se favorecía el crecimiento de algunas especies de microalgas (Cleuvers, 2014; de Wilt *et al.*, 2016; Zhang *et al.*, 2019), lo cual es congruente a los resultados obtenidos en este trabajo.

Se observó que las 6 microalgas analizadas en esta sección tienen el potencial de crecer a concentraciones de diclofenaco muy superiores a las reportadas en aguas

residuales ( $0.35\text{-}4.11 \mu\text{g L}^{-1}$ ) (Vieno y Sillanpää, 2014; Robledo *et al.*, 2017), por lo que se esperaría que crecieran adecuadamente a concentraciones bajas del fármaco y serían capaces de removerlo de la solución utilizándolo como fuente de carbono.

Con base en los resultados de las cinéticas de crecimiento anteriores, las concentraciones de diclofenaco que se establecieron para los estudios de remoción para cada una de las microalgas se muestran en la Tabla 10.

**Tabla 10. Concentraciones de diclofenaco para evaluar su remoción por cada microalga.**

Microalga	Medio de cultivo	Concentración de diclofenaco ( $\mu\text{g mL}^{-1}$ )
<i>C. vulgaris</i> OW-01	Basal Bold	10
<i>N. oculata</i> CCAP 849/7	Basal Bold	10
<i>S. acutus</i> UTEX 72	Basal Bold	8.7
<i>S. obliquus</i> CCAP 276/2	Basal Bold	8.7
<i>C. reinhardtii</i> CC137	TAP	5
<i>C. reinhardtii</i> CC1731	TAP	5

Las concentraciones descritas en la Tabla 10 fueron seleccionadas con base en los cultivos que presentaron una mayor estimulación en el desarrollo en cada microalga y así realizar una comparación en su comportamiento en los experimentos de exposición al fármaco. Para *C. vulgaris* y *N. oculata* se estableció la concentración de  $10 \mu\text{g mL}^{-1}$ , en el caso de las cepas de *Scenedesmus* la concentración establecida fue de  $8.7 \mu\text{g mL}^{-1}$ , mientras que para las microalgas *C. reinhardtii* se seleccionó la concentración de  $5 \mu\text{g mL}^{-1}$ . Para los análisis posteriores, el tiempo de exposición de diclofenaco fue establecido de forma independiente para cada microalga, de acuerdo al tiempo en el que alcanzaron su fase estacionaria.

#### 4.1.2. Efecto de la composición del medio de cultivo sobre el crecimiento de las microalgas por medio de la cuantificación de *clorofila a*

Después de establecer la concentración de diclofenaco a la que se expondrá cada especie de microalga (Tabla 10), se evaluó el crecimiento de cada una variando las concentraciones iniciales de carbono, nitrógeno y fósforo (50 y 100% de la concentración original), en ausencia (control) y presencia de diclofenaco (Tabla 9). Para determinar las mejores condiciones de desarrollo de la microalga, se analizó el crecimiento de cada una de las especies por medio de densidad óptica (Apéndice 8.1) y cuantificación de *clorofila a*.

Para analizar el efecto de variaciones de C, N y P en el medio de cultivo sobre el desarrollo de las microalgas, se agregaron 70 mL de medio (TAP o Bold, según la microalga) en 8 matraces Erlenmeyer de 100 mL (para las diferentes concentraciones de C, N y P; 50 y 100%), añadiendo 7 mL de preinóculo, el cual se ajustó a una OD<sub>750nm</sub> inicial de 0.25 y se adicionó el volumen necesario para las concentraciones establecidas de diclofenaco. Se mantuvieron en agitación continua sin aireación con fotoperiodo de 16 h luz y 8 h oscuridad, hasta llegar a su fase estacionaria. Se tomó una alícuota de 2.5 mL de los cultivos cada 48 h. Esto se realizó en experimentos independientes entre cada microalga. Los datos obtenidos son el promedio de tres réplicas biológicas.

La *clorofila a* es el principal compuesto fotoquímicamente activo de las microalgas y se comporta como un receptor de luz para impulsar la fotosíntesis. El contenido de *clorofila a* influye en la producción de biomasa y por lo tanto en la acumulación de compuestos, comportándose como un indicador del estado fisiológico de las microalgas (tasa de crecimiento y toxicidad) (Boilling y Fiehn, 2005; Su *et al.*, 2008). Para la cuantificación de *clorofila a*, se tomó 1 mL de muestra y se realizó una extracción con metanol absoluto. La muestra fue analizada por Espectrofotometría UV-Vis y el contenido de clorofila se calculó utilizando la Ecuación 1, descrita en la sección 4.5.

Las gráficas del efecto del déficit de nutrientes (C, N y P) en el medio de cultivo en muestras de biomasa de las 8 combinaciones en ausencia y presencia de diclofenaco ( $10 \mu\text{g mL}^{-1}$ ) de *C. vulgaris* se observan en la Figura 12.

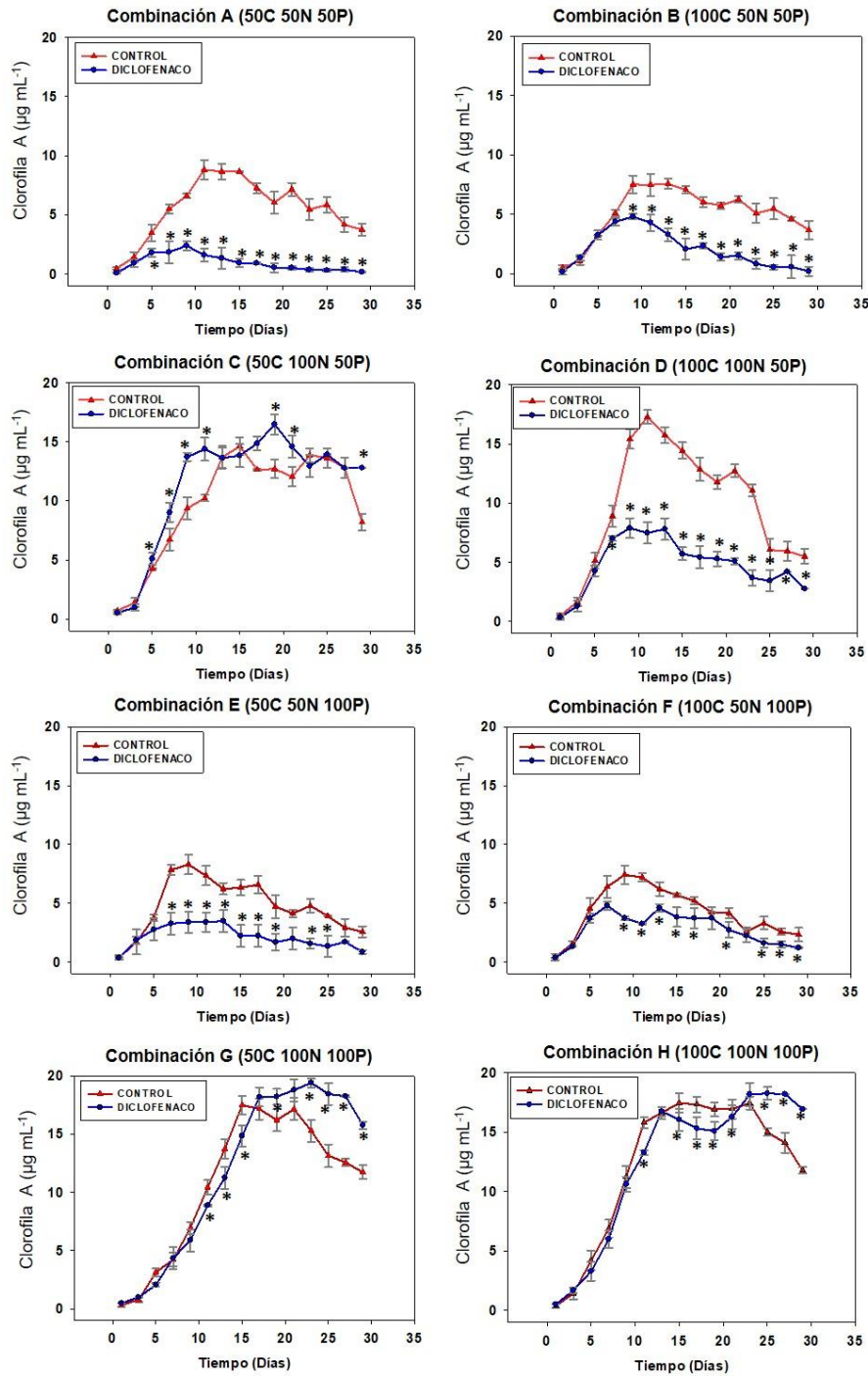


Figura 12. Efecto de C, N y P en el medio de cultivo en presencia y ausencia de diclofenaco ( $10 \mu\text{g mL}^{-1}$ ) en *C. vulgaris*. Diferencias significativas ( $p < 0.05$ ) en el crecimiento respecto al control se marcan con un asterisco (\*). Prueba de Fisher.

Se observó que en las combinaciones C (50C, 100N, 50P) y G (50C, 100N, 100P) el cultivo con diclofenaco presentó un desarrollo significativamente mayor a sus correspondientes cultivos controles. Mientras que en las combinaciones A (50C, 50N, 50P), B (100C, 500N, 50P), D (100C, 100N, 50P), E (50C, 50N, 100P) y F (100C, 50N, 100P) sucedió lo contrario, el cultivo con diclofenaco presentó un desarrollo significativamente menor, lo cual se atribuye a la adición de diclofenaco. La combinación H (100C, 100N, 100P) comenzó con una tendencia similar al control, disminuyendo significativamente el crecimiento a partir del día 13 y alcanzando un mayor desarrollo a partir del día 23 y hasta el final de la cinética. Es probable que, a diferencia del control, el cultivo con diclofenaco sostuvo el desarrollo de la microalga por más tiempo, tomando el diclofenaco como una fuente adicional de C.

En contraste a los resultados obtenidos en este trabajo, de Wilt *et al.* (2016) realizaron estudios en *Chlorella sorokiniana* donde administraron una mezcla de fármacos ( $\sim 100\text{--}350 \mu\text{g L}^{-1}$ ) incluido el diclofenaco, observando que el diclofenaco no produjo cambios en el contenido de *clorofila a*. En otro estudio, Escapa *et al.* (2017) evaluó la modificación en el contenido de *clorofila a* en *C. sorokiniana* y *C. vulgaris* al adicionar diclofenaco en una concentración de  $25 \mu\text{g mL}^{-1}$ ; ambas microalgas presentaron un mayor contenido de *clorofila a*. Por otro lado, Zhang *et al.* (2019) evaluaron la influencia de diclofenaco (en concentraciones desde 2 hasta  $150 \mu\text{g mL}^{-1}$ ) en *Chlorella pyrenoidosa*, observado que en concentraciones superiores a  $40 \mu\text{g mL}^{-1}$  el contenido de *clorofila a* disminuyó significativamente.

Estas variaciones pueden deberse a la diferencia entre las especies utilizadas, se ha reportado que todas las microalgas de la misma especie presentan un comportamiento muy similar en los diferentes parámetros bioquímicos que se analizan. Sin embargo, incluso entre la misma especie pueden darse diferencias debido a las condiciones de crecimiento y nutrientes, entre otros (Hernández-Pérez y Labbé, 2014).

En la Figura 13 se muestran las gráficas del efecto del déficit de nutrientes (C, N y P) en el medio de cultivo en muestras de biomasa de las 8 combinaciones en ausencia y presencia de diclofenaco ( $10 \mu\text{g mL}^{-1}$ ) de *N. oculata*.

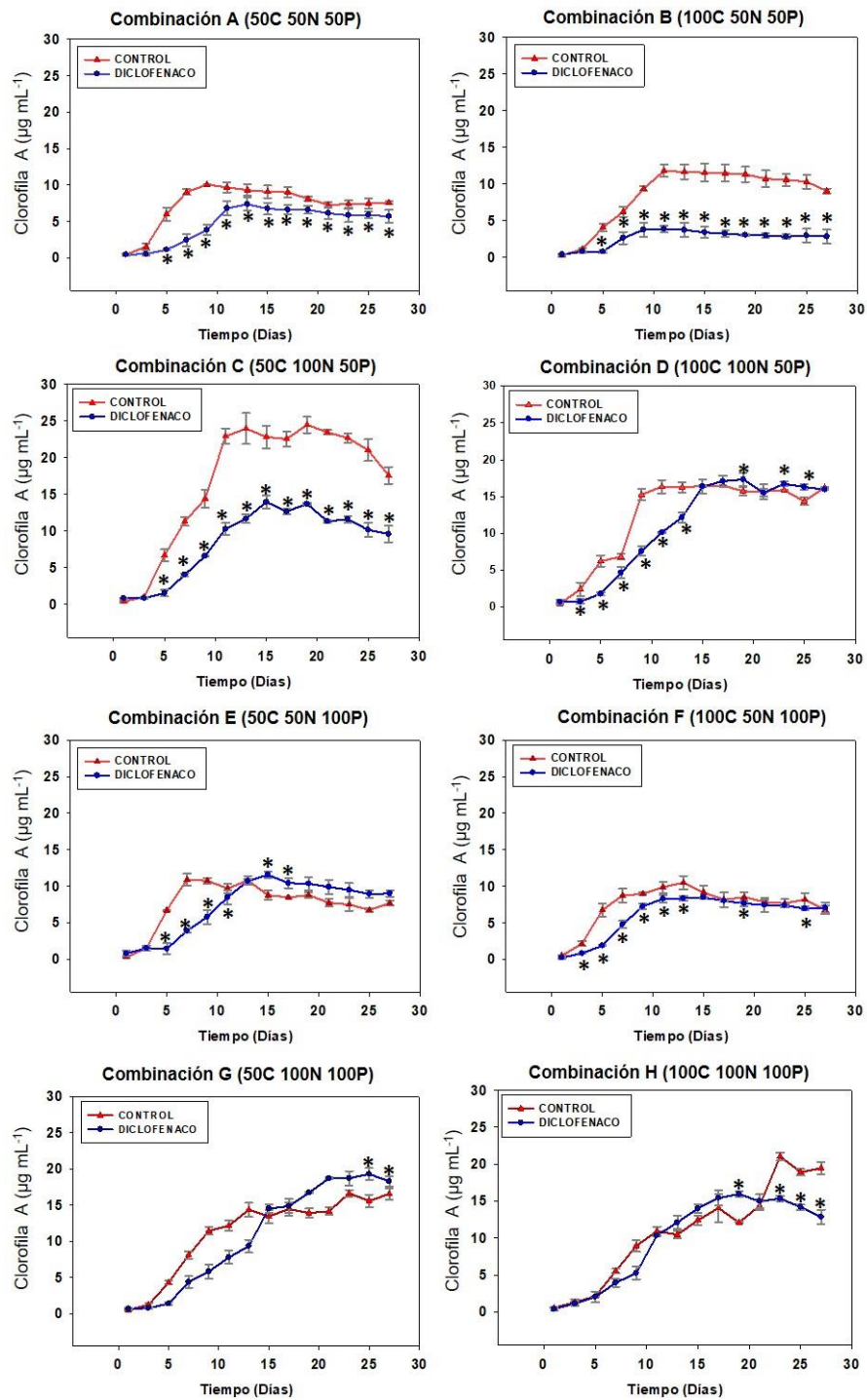


Figura 13. Efecto de C, N y P en el medio de cultivo en presencia y ausencia de diclofenaco ( $10 \mu\text{g mL}^{-1}$ ) en *N. oculata*. Diferencias significativas ( $p < 0.05$ ) en el crecimiento respecto al control se marcan con un asterisco (\*). Prueba de Fisher.

*N. oculata* mostró un comportamiento similar en las gráficas de las combinaciones A (50C, 50N, 50P), B (100C, 50N, 50P), C (50C, 100N, 50P), D (100C, 100N, 50P), E (50C, 50N, 100P) y F (100C, 50N, 100P), donde el cultivo con diclofenaco produjo un crecimiento significativamente menor a sus respectivos controles a lo largo de la cinética. Mientras que en las combinaciones G (50C, 100N, 100P) y H (100C, 100N, 100P) mantuvieron un crecimiento similar a los cultivos control.

Se ha reportado que el tamaño y la forma de *Nannochloropsis gaditana* son susceptibles de variación con las condiciones de cultivo y a lo largo de su crecimiento, lo cual puede ser congruente con las variaciones en el crecimiento observadas en este trabajo en los cultivos con diclofenaco en comparación a sus respectivos controles para *N. oculata*, al ser del mismo género mantienen comportamiento similar (Lubián, 1982).

Además, se ha reportado para diversas microalga, entre ellas el género *Nannochloropsis*, que la reducción del contenido de clorofila indica toxicidad xenobiótica, inhibición de la fotosíntesis y otros procesos metabólicos relacionados con el crecimiento (Vannini *et al.*, 2011; Moro *et al.*, 2014).

En la Figura 14 se muestran las gráficas del efecto del déficit de nutrientes (C, N y P) en el medio de cultivo en muestras de biomasa de las 8 combinaciones en ausencia y presencia de diclofenaco ( $8.7 \mu\text{g mL}^{-1}$ ) para *S. acutus*.

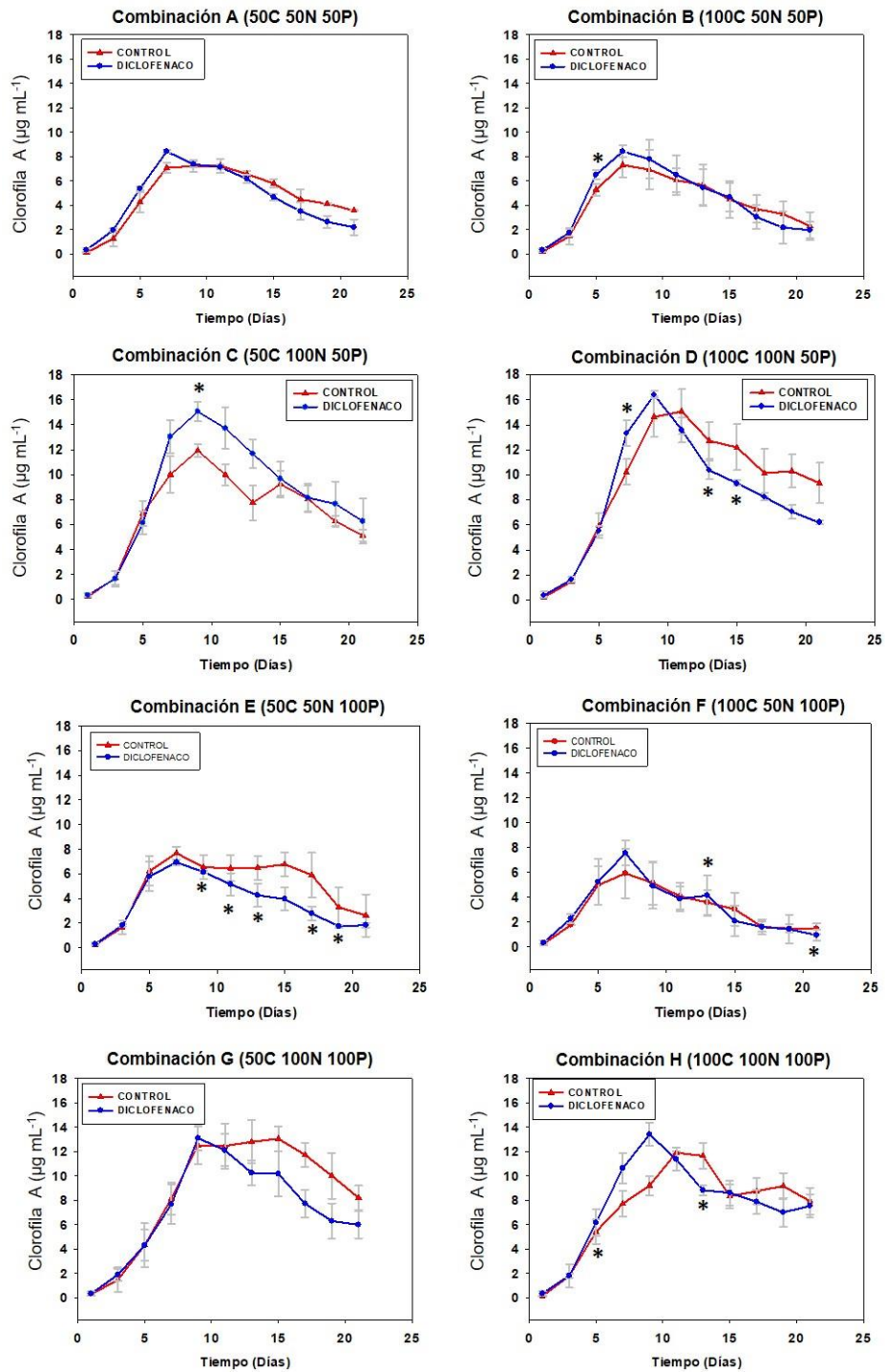


Figura 14. Efecto de C, N y P en el medio de cultivo en presencia y ausencia de diclofenaco ( $8.7 \mu\text{g mL}^{-1}$ ) en *S. acutus*. Diferencias significativas ( $p < 0.05$ ) en el crecimiento respecto al control se marcan con un asterisco (\*). Prueba de Fisher.

En las gráficas de *S. acutus* se observó un comportamiento similar entre los cultivos con diclofenaco y sus respectivos cultivos control (sin fármaco) en cada combinación, excepto para la combinación E (50C, 50N, 100P) donde el cultivo con diclofenaco mostró un crecimiento significativamente menor al control.

No se encuentra reportado en la literatura el efecto de este fármaco en *S. acutus*; sin embargo, Schmitt-Jansen *et al.* (2007), evaluaron la fitotoxicidad del diclofenaco a una concentración de  $50 \mu\text{g mL}^{-1}$  en *Scenedesmus vacuolatus* sin encontrar modificación en el contenido de *clorofila a*. Aunque es diferente especie, se infiere que presentan un comportamiento similar por pertenecer al mismo género.

En la Figura 15 se muestran las gráficas del efecto del déficit de nutrientes (C, N y P) en el medio de cultivo en muestras de biomasa de las 8 combinaciones en ausencia y presencia de diclofenaco ( $8.7 \mu\text{g mL}^{-1}$ ) de *S. obliquus*.

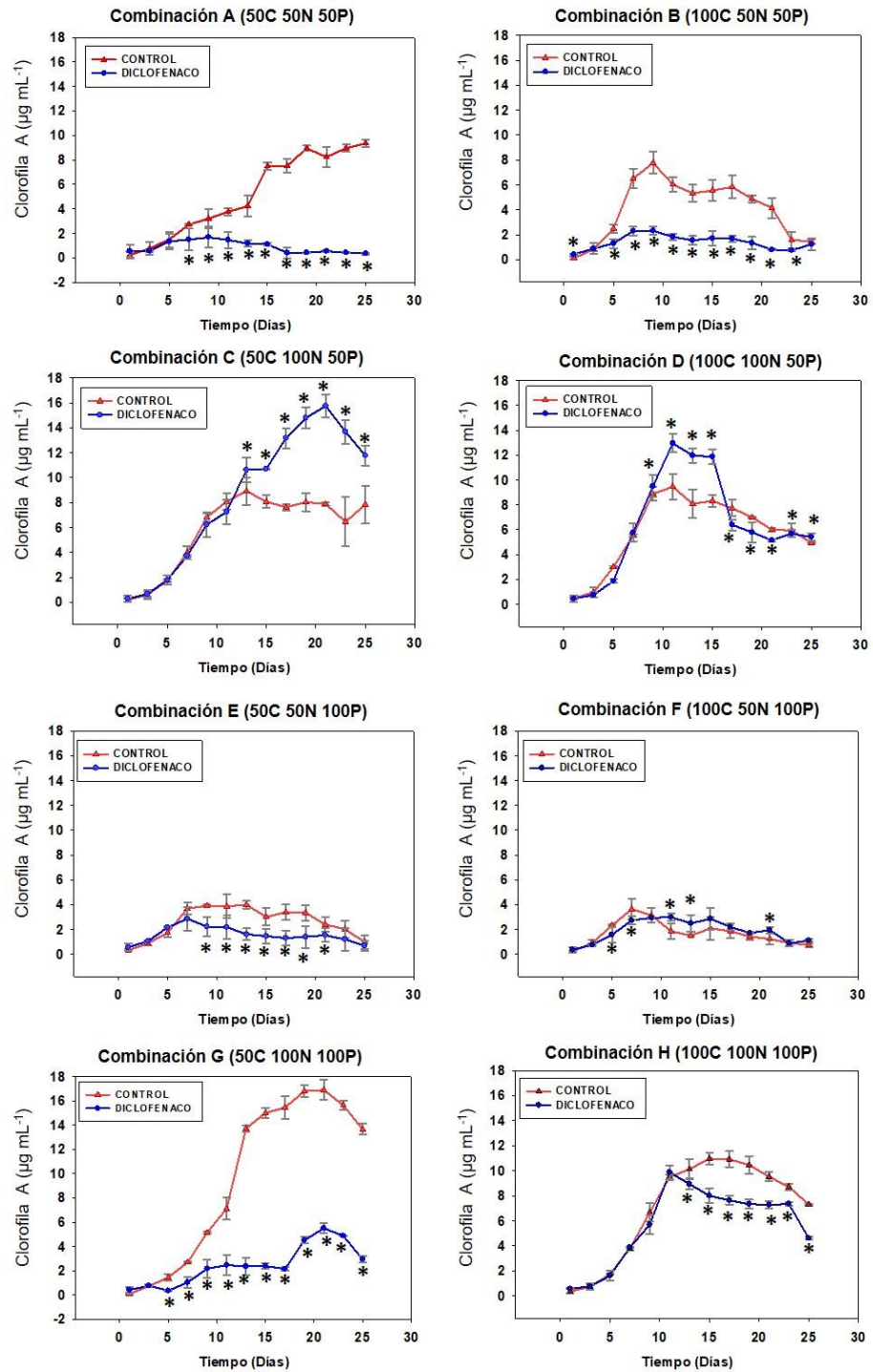


Figura 15. Efecto de C, N y P en el medio de cultivo en presencia y ausencia de diclofenaco ( $8.7 \mu\text{g mL}^{-1}$ ) en *S. obliquus*. Diferencias significativas ( $p < 0.05$ ) en el crecimiento respecto al control se marcan con un asterisco (\*). Prueba de Fisher.

En contraste a lo observado en *S. acutus*, se mostró un comportamiento diferente entre los cultivos de *S. obliquus* en cada combinación, donde en las combinaciones A (50C, 50N, 50P), B (100C, 50N, 50P), E (50C, 50N, 100P), G (50C, 100N, 100P) y H (100C, 100N, 100P), los cultivos con diclofenaco, mostraron un crecimiento significativamente menor al control. Mientras que las combinaciones C (50C, 100N, 50P) y D (100C, 100N, 50P) mostraron un comportamiento contrario, siendo el cultivo con diclofenaco significativamente mayor al cultivo control. En cuanto a la combinación F (100C, 50N, 100P) mantuvo un comportamiento similar a lo largo de toda la cinética. Se observa que el cultivo control de la combinación G (50C, 100N, 100P) presenta un crecimiento significativamente mayor con respecto a los cultivos controles de las demás combinaciones; de manera particular, esto concuerda con lo reportado por Shashirekha *et al.*, (2016) quienes evaluaron la remoción de nutrientes (C, N y P) por *S. obliquus*, así como la relación óptima de dichos nutrientes para el crecimiento de la microalga, registrando la mejor proporción en términos de rendimiento de biomasa en un medio con baja concentración de carbono (CO<sub>2</sub>) y altas concentraciones de nitrógeno y fósforo. Los resultados indican, además, que *S. obliquus* puede adaptarse a diferentes concentraciones de sustratos de carbono y que demuestran su versatilidad para pasar de crecimiento fototrófico a heterótrofo. Algunos de los estudios anteriores también han demostrado capacidad de *Scenedesmus sp.* para utilizar carbono de fuentes inorgánicas y orgánicas, como es el caso de este trabajo, donde se le proporciona una fuente de carbono inorgánico (CO<sub>2</sub>) y una fuente de carbono orgánico (diclofenaco)(Sun *et al.* 2008; Bhatnagar *et al.* 2011; Shashirekha *et al.*, 2016).

Estas variaciones en los cultivos con diclofenaco podrían deberse a la fuente de carbono existente en el cultivo asociada a la adición del fármaco. De acuerdo con Sánchez-Torres *et al.*, (2008) las microalgas pueden tomar como nutrientes compuestos orgánicos presentes en el medio (en este caso, el diclofenaco), lo que sugiere que las microalgas pueden internalizar estos compuestos para el crecimiento. A la vista de los resultados obtenidos, se puede inferir que la presencia de diclofenaco modificó el crecimiento.

Se ha reportado el efecto del diclofenaco en *S. obliquus* en un medio modificado por Zhu *et al.* (2014), donde a concentraciones de 5 a 10  $\mu\text{g mL}^{-1}$  de este fármaco se observa una disminución en el contenido de clorofila; sin embargo, contrario a esto, Escapa *et al.* (2017) indica que el diclofenaco a una concentración de 25  $\mu\text{g mL}^{-1}$  favoreció la producción de *clorofila a* en *S. obliquus* en medio de cultivo Mann and Myers. Se infiere que las diferencias en ambos trabajos se originan por las condiciones de cultivo, ya que hay diferencia en los medios de cultivo, en la temperatura y el fotoperiodo. Ambos resultados son congruentes con lo observado, ya que en algunos cultivos el diclofenaco propicia un incremento en el crecimiento y en otros disminuye.

Las microalgas *C. vulgaris*, *N. oculata*, *S. acutus* y *S. obliquus* presentaron una fase de adaptación los primeros 3 días en todos los experimentos. Esta fase se presenta cuando las células del inóculo no se encuentran en condiciones metabólicas adecuadas por lo que se propicia un retardo en el crecimiento. Dicho retraso se atribuye a la fisiología de adaptación del metabolismo de la célula para el crecimiento, como el aumento de los niveles enzimáticos y metabolitos implicados en la división celular y la fijación de carbono (Maldonado-Barraza, 2011).

También se observó un crecimiento diaúxico en los cultivos, el cual es un tipo de crecimiento bifásico que tiene lugar cuando hay presentes dos sustratos diferentes que pueden ser utilizados como fuente de carbono (crecimiento mixotrófico), en este caso podría deberse a la fuente de carbono en los medios de cultivo y al diclofenaco. Según lo reportado en la literatura, las microalgas al contar con un metabolismo mixotrófico, limitan el impacto de la pérdida de biomasa durante la respiración y reduce la cantidad de sustratos orgánicos utilizados para crecer. Esto ofrece la posibilidad de incrementar la densidad celular y la productividad de lípidos eliminando ciertos requerimientos (nutrientes, luz) (Liang *et al.*, 2009; Wang *et al.*, 2012; Yeh y Chang, 2012).

El déficit de carbono, en el caso de *N. oculata* (Figura 13) y *S. acutus* (Figura 14) no presentó un efecto sobre el crecimiento en ninguno de los experimentos, tanto en el cultivo control como en el cultivo con diclofenaco. Sin embargo, en *C. vulgaris*, al comparar los experimentos C (C50 N100 P50) y D (C100 N100 P50) en los cultivos

con diclofenaco se observó un menor desarrollo, lo que se puede atribuir a la adición del fármaco y posiblemente a la limitación del fósforo ya que el cultivo control respectivo no muestra diferencias significativas entre los experimentos C y D. *S. obliquus* (Figura 15) presenta una diferencia significativa en el crecimiento en el cultivo con diclofenaco para el experimento G (C50 N100 P100) en comparación con el experimento H (C100 N100 P100), esta diferencia podría estar asociada a la adición de diclofenaco. Sin embargo, al realizar el análisis estadístico comparando los cultivos de control de ambos experimentos no se encontraron diferencias significativas. Esto podría interpretarse de la siguiente manera, el estrés generado por el déficit de nitrógeno, en comparación con la fuente de carbono, puede afectar la respuesta de las células a la disponibilidad de nutrientes y por tanto afectar las tasas de crecimiento y consumo de la fuente de carbono. El metabolismo del CO<sub>2</sub> está fuertemente relacionado con la asimilación del nitrógeno debido al costo energético celular (Barajas *et al.*, 2012). Aunque también se ha reportado que la aireación enriquecida con CO<sub>2</sub> promueve el crecimiento de *Nannochloropsis* sp., en comparación con cultivos aireados con niveles ambientales de CO<sub>2</sub> (~0.03%) (Hu y Gaol, 2003), esto no concuerda con los resultados obtenidos en este trabajo ya que el carbono no demostró ningún efecto en el crecimiento para las microalgas tratadas.

Los resultados mostraron el mayor crecimiento en las combinaciones donde el nitrógeno es de 100%, lo cual es de esperarse ya que el nitrógeno es un precursor de biomoléculas nitrogenadas entre las que se incluyen las bases nitrogenadas (precursoras de ADN y ARN indispensables para la división y multiplicación general) y los aminoácidos, los cuales dan lugar a la biosíntesis de proteínas (biomasa) y las enzimas que participan en las reacciones de biosíntesis (anabolismo). En las 4 microalgas (*C. vulgaris*, *N. oculata*, *S. acutus* y *S. obliquus*) se observó una correlación, a mayor concentración de la fuente de nitrógeno mayor desarrollo. De acuerdo con Pérez *et al.* (2011), el nitrógeno es el nutriente que determina el crecimiento de microalgas ya que es necesario para la fijación de CO<sub>2</sub> en cultivos autotróficos o para la asimilación de carbono en cultivos heterotróficos. Además, se ha demostrado que la limitación de nitrógeno influye directamente en la formación de aminoácidos, lo que

limita la transcripción de ARNm y, por lo tanto, reduce la síntesis de proteínas. Por otro lado, la eficiencia del fotosistema II (PSII) disminuye inicialmente como consecuencia de la disipación térmica de la energía de excitación absorbida en el lecho pigmentario; resultando en una reducción en la tasa de fotosíntesis, lo que a su vez conduce a una reducción en la tasa de respiración (Barsanti y Gualtieri, 2014). Los resultados obtenidos en este trabajo son consistentes con lo reportado por diversos autores, quienes indicaron que la restricción de nitrógeno produce un declive en el contenido de *clorofila a* es decir, un menor crecimiento, mientras que un alto crecimiento, se presenta en condiciones normales o bajo condiciones de exceso de nitrógeno, esto se ha reportado para *Nannochloropsis* sp. y *Nannochloropsis oculata* (Pal *et al.*, 2011; Catalá, 2013), *C. vulgaris*, *C. sorokiniana*, *Scenedesmus dimorphus* y *S. acutus* (Chacón *et al.*, 2004; González, 2010; Maldonado-Barraza, 2011). Se puede concluir que para diversas microalgas existe una relación lineal entre el crecimiento y la concentración de nitrógeno (Yang *et al.*, 1997; Loreto *et al.*, 2013).

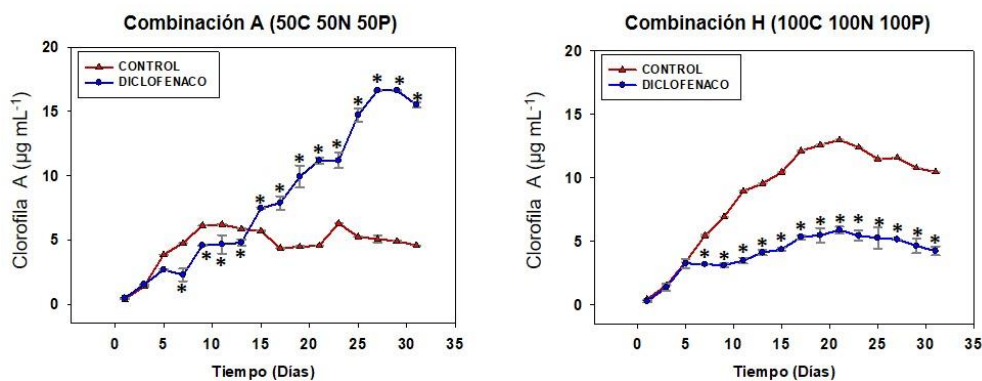
En el caso del fósforo, *C. vulgaris*, *N. oculata* y *S. acutus* no mostraron una diferencia significativa en su desarrollo para los experimentos con deficiencia de este nutriente. Aunque el fósforo no es precursor de la biosíntesis de *clorofila a*, se ha reportado que juega un papel importante en la mayoría de los procesos celulares, especialmente los que están implicados en la generación y transformación de energía metabólica, resultando indispensable para el crecimiento y reproducción de las microalgas (Stewart, 1974). Sin embargo, muchos grupos de algas tienen la capacidad de producir y almacenar polifosfatos en pequeñas vacuolas para después descomponerse mediante la actividad enzimática y liberar moléculas de fosfato que se utilizarán en el metabolismo celular (Brönmark y Hansson, 2005). Aunque se informa que el fósforo a bajas concentraciones puede limitar el crecimiento de algunas especies de algas, de igual manera se ha comprobado que las microalgas pueden absorber fósforo en exceso y sobrevivir durante algún tiempo en aguas deficientes de fosfato (Round, 1973). Esto debido a que el ion fosfato ( $\text{PO}_4^{3-}$ ) ingresa a las células con ayuda de las enzimas fosfatasa ácida y alcalina, las cuales son responsables de la mineralización del fósforo orgánico y de la liberación del fósforo inorgánico necesario

para las microalgas, después es almacenado en la célula dentro de gránulos citoplasmáticos en forma de polifosfatos y puede ser utilizado posteriormente por el microorganismo (Grobbelaar, 2004). Esto concuerda con lo reportado por diversos autores quienes evaluaron el efecto del fósforo en diversas microalgas (*C. vulgaris*, *C. sorokiniana*, *Scenedesmus dimorphus* y *S. acutus*), donde el déficit del fósforo causa disminución en el contenido de *clorofila a* de las microalgas analizadas. Sin embargo, al presentarse también el déficit de nitrógeno, el fósforo ya no influye de manera significativa en el crecimiento; es decir, el déficit de N afecta más que el déficit de P, además se requiere en muy bajas concentraciones si se compara con los requerimientos de C y N (Chacón *et al.*, 2004; González, 2010; Maldonado-Barraza, 2011). En los cultivos control con deficiencia de fósforo de *S. obliquus*, las combinaciones A (C50 N50 P50) y B (C100 N50 P50), muestran un mayor crecimiento con respecto a las combinaciones E (C50 N50 P100) y F (C100 N50 P100), respectivamente. Esta inhibición en el crecimiento en los cultivos con 100% de fósforo puede deberse a la unión de P en los componentes intracelulares causados por la sobreacumulación de polifosfato (Li *et al.*, 2018). Además, se ha reportado que los fosfonatos inhiben el crecimiento de microalgas después de 10 días de cultivo debido a la posible interrupción de la asimilación de hierro a través de la complejación (Wang *et al.*, 2020).

Hay estudios donde se reporta que algunas microalgas pueden crecer de manera óptima en medios con déficit de nitrógeno y fósforo, pero que tal vez este crecimiento se debe a un mejor balance N:P (Sánchez-Torres *et al.*, 2008; Emparan *et al.*, 2020).

En el caso de las microalgas *C. reinhardtii* CC137 y CC1731, al no encontrar un efecto significativo en las diferentes combinaciones de nutrientes (C, N, P), solo se analizaron las combinaciones A (C50 N50 P50) y H (C100 N100 P100). No se presentó ninguna fase de adaptación, pero si se observó un crecimiento diaúxico en los cultivos.

En la Figura 16 se muestran las gráficas del efecto del déficit de nutrientes (C, N y P) en el medio de cultivo en muestras de biomasa de las 2 combinaciones en ausencia y presencia de diclofenaco ( $5 \mu\text{g mL}^{-1}$ ) en *C. reinhardtii* CC137.

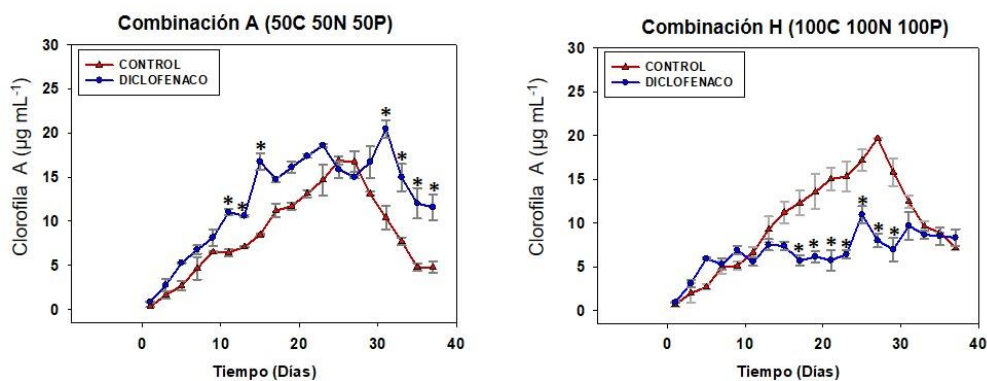


**Figura 16. Efecto de C, N y P en el medio de cultivo en presencia y ausencia de diclofenaco ( $5 \mu\text{g mL}^{-1}$ ) en *C. reinhardtii* CC137.** Diferencias significativas ( $p < 0.05$ ) en el crecimiento respecto al control se marcan con un asterisco (\*). Prueba de Fisher.

Al comparar la combinación A (50C 50N 50P) con la combinación H (100C 100N 100P) se observó un menor crecimiento en el cultivo control de la combinación A. Hun-Arenas (2010) evaluó el crecimiento y contenido de *clorofila a* de *C. reinhardtii* en diferentes concentraciones de nutrientes y observó que a mayor concentración de la solución nutritiva no aumenta el contenido de *clorofila a*; sin embargo, concentraciones deficientes de nutrientes si disminuye el contenido de *clorofila a*, lo que concuerda con lo observado en la combinación A.

En el caso de los cultivos con diclofenaco, en la combinación A (50C, 50N, 50P) el cultivo mostró un crecimiento significativamente mayor que el control, en comparación a la combinación H (100C, 100N, 100P) donde sucedió lo contrario, la microalga disminuyó el desarrollo al adicionar el diclofenaco. Se ha reportado que el exceso de carbono provoca una alta generación de  $\text{O}_2$  y esto puede generar el agotamiento del carbono y la sobresaturación del oxígeno, en estas circunstancias la fotorrespiración se hace importante y se produce una gran pérdida de productividad y por lo tanto bajas en el crecimiento (Richmond, 2004; Xiong *et al.*, 2010).

En la Figura 17 se muestran las gráficas del efecto del déficit de nutrientes (C, N y P) en el medio de cultivo en muestras de biomasa de las 2 combinaciones en ausencia y presencia de diclofenaco ( $5 \mu\text{g mL}^{-1}$ ) en *C. reinhardtii* CC1731.



**Figura 17. Efecto de C, N y P en el medio de cultivo en presencia y ausencia de diclofenaco ( $5 \mu\text{g mL}^{-1}$ ) en *C. reinhardtii* CC1731.** Diferencias significativas ( $p < 0.05$ ) en el crecimiento respecto al control se marcan con un asterisco (\*). Prueba de Fisher.

*C. reinhardtii* CC1731 no presenta modificación en el crecimiento relacionado con el déficit de nutrientes, esto puede deberse a la composición del medio utilizado (TAP) o también al carácter mixotrófico de la microalga (Wang *et al.*, 2012).

Estos resultados concuerdan con lo descrito por Brönmark y Hansson (2005) quienes indican que varios grupos algales pueden desarrollar una adaptación para asegurar la disponibilidad de nutrientes mediante la asimilación excesiva de éstos usualmente limitantes o almacenamiento en vacuolas, durante periodos en que se presentan altas concentraciones sin mostrar afectaciones en el crecimiento.

La combinación H (100C 100N 100P) de *C. reinhardtii* CC137 y CC1731, presenta una disminución en el desarrollo de los cultivos con diclofenaco con respecto a su control, este resultado correlaciona con lo obtenido por Majewska *et al.* (2018) y Martínez (2018) quienes observaron una reducción significativa del contenido de *clorofila a* en los cultivos expuestos a diclofenaco con respecto al control.

Las gráficas del efecto del déficit de nutrientes (C, N y P) en el medio de cultivo en ausencia y presencia de diclofenaco de las 6 microalgas muestran un

comportamiento diaúxico, el cual según la literatura ocurre cuando un organismo utiliza preferentemente un sustrato como fuente de carbono y cuando éste se agota, comienza a metabolizar otro sustrato secundario. Este comportamiento diaúxico ha sido reportado en las microalgas *C. sorokiniana* y *A. protothecoides*, las cuales utilizan preferencialmente el acetato como fuente de carbono, pero cuando éste se agota, asimilan butirato como fuente alterna de carbono para continuar su crecimiento (Turon *et al.*, 2015). Narang y Pilyugin (2005) señalaron que cuando los microorganismos se cultivan con dos sustratos sustituibles, por ejemplo dos fuentes de carbono, tienden a agotar preferentemente el que mantiene una mayor tasa de crecimiento que es lo que posiblemente puede estar sucediendo en este estudio, en donde la eliminación de acetato es más rápida y más eficiente en el caso de *C. reinhardtii* CC1731 y CC137 y del CO<sub>2</sub> en el caso de *C. vulgaris*, *N. oculata*, *S. acutus* y *S. obliquus* (que el consumo del carbono proporcionada por el diclofenaco).

#### **4.1.3. Cuantificación de diclofenaco removido del medio de cultivo durante el desarrollo de las microalgas**

Con el objetivo de determinar la capacidad de remoción del diclofenaco por las 6 cepas de microalgas de los cultivos expuestos al fármaco y bajo distintas concentraciones de fuente carbono, nitrógeno y fósforo se cuantificó la concentración del fármaco en el medio de cultivo al final de la cinética de crecimiento de cada microalga. Al valor obtenido se restó la concentración inicial de diclofenaco, con el fin de obtener el porcentaje de remoción del fármaco por cada cepa de microalga. Este análisis cuenta con 3 réplicas biológicas.

En la Tabla 11 se observan los porcentajes de diclofenaco removido del medio Basal Bold por *C. vulgaris*, *N. oculata*, *S. acutus* y *S. obliquus*. Las cepas que mejor capacidad de remoción mostraron fueron *S. obliquus* y *C. vulgaris*, seguidas de *S. acutus*, mientras que la que presentó los menores porcentajes de remoción fue *N. oculata*.

**Tabla 11. Porcentaje de remoción de diclofenaco por las microalgas *C. vulgaris*, *N. oculata*, *S. acutus* y *S. obliquus* con diferentes concentraciones de nitrógeno, fósforo y carbono.**

Combinación	<i>C. vulgaris</i>	<i>N. oculata</i>	<i>S. acutus</i>	<i>S. obliquus</i>
	% de remoción	% de remoción	% de remoción	% de remoción
<b>A</b> 50C 50N 50P	80.3 <sup>a</sup> ± 3.7	59.8 <sup>b</sup> ± 2.4	80.08 <sup>a</sup> ± 7.4	81.4 <sup>a</sup> ± 4.8
<b>B</b> 100C 50N 50P	84.7 <sup>a</sup> ± 14.1	60.6 <sup>a</sup> ± 6.3	77.9 <sup>a</sup> ± 11.4	79.9 <sup>a</sup> ± 0.07
<b>C</b> 50C 100N 50P	87.6 <sup>a</sup> ± 8.7	72.4 <sup>a</sup> ± 10.7	88.7 <sup>a</sup> ± 8.3	87.8 <sup>a</sup> ± 10.5
<b>D</b> 100C 100N 50P	84.9 <sup>a</sup> ± 11.6	74.9 <sup>a</sup> ± 10.2	87.7 <sup>a</sup> ± 8.1	90.6 <sup>a</sup> ± 8.0
<b>E</b> 50C 50N 100P	87.8 <sup>a</sup> ± 10.9	70.3 <sup>a</sup> ± 3.9	85.7 <sup>a</sup> ± 9.8	88.2 <sup>a</sup> ± 4.9
<b>F</b> 100C 50N 100P	90.3 <sup>a</sup> ± 9.8	77.5 <sup>a</sup> ± 15.5	83.3 <sup>a</sup> ± 11.3	91.1 <sup>a</sup> ± 8.2
<b>G</b> 50C 100N 100P	84.4 <sup>a</sup> ± 14.1	68.8 <sup>a</sup> ± 15.4	81.9 <sup>a</sup> ± 8.9	88.7 <sup>a</sup> ± 10.5
<b>H</b> 100C 100N 100P	83.5 <sup>ab</sup> ± 2.0	77.9 <sup>b</sup> ± 2.6	80.6 <sup>ab</sup> ± 4.8	86.2 <sup>a</sup> ± 4.3

Valores con letras distintas indican diferencias estadísticamente significativas en el porcentaje de remoción entre microalgas de cada experimento (ANOVA,  $p > 0.05$ . Prueba de Fisher)

Los porcentajes de remoción superiores al 90% fueron con *S. obliquus* (91.1%) y *C. vulgaris* (90.3%) en la combinación F (100C 50N 100P). En el caso de *S. acutus*, el porcentaje más alto fue con la combinación C (50C 100N 50P) a los 21 días, mientras que *N. oculata* alcanzó un 77.9% de remoción en la combinación H (100C 100N 100P) a los 27 días de la cinética. Al realizar el análisis estadístico, no se obtuvo diferencia significativa entre los porcentajes de remoción obtenidos en las 8 combinaciones de cada una de las microalgas. Pero sí se presentó una diferencia significativa en la combinación H (100C 100N 100P) para *N. oculata* con respecto al porcentaje obtenido en *S. obliquus*.

Al comparar los experimentos H (100C 100N 100P) y A (50C 50N 50P) se observó que en las cuatro microalgas se obtuvo un mayor porcentaje de remoción para la combinación H (100C 100N 100P). La remoción fue del orden de 83.5, 77.9, 80.6 y 86.2% para *C. vulgaris*, *N. oculata*, *S. acutus* y *S. obliquus*; respectivamente, mientras que para la combinación A los porcentajes correspondientes fueron 80.3, 59.8, 80 y 81.4%. Al comienzo del estudio, nuestra hipótesis era que el experimento A (50C 50N 50P) lograría un mayor porcentaje de remoción al tener un déficit de nutrientes, lo que podría inducir a las microalgas a usar diclofenaco como fuente de carbono; no obstante, al analizar los resultados, la diferencia de nutrientes no influyó en la remoción del fármaco.

Debido a que no se encontró diferencia significativa para las 4 microalgas en las 8 combinaciones de nutrientes, para las dos cepas de *C. reinhardtii*, CC137 y CC1731 solo se evaluó la remoción en la combinación A (50C 50N 50P) y la combinación H (100C 100N 100P) en medio TAP, los resultados se muestran en la Tabla 12.

El mayor porcentaje de remoción se observó en la combinación A con ambas microalgas, 50.3% para *C. reinhardtii* CC1731 y 34.7% para *C. reinhardtii* CC137. Los porcentajes de remoción obtenidos por *C. reinhardtii* CC137 fueron significativamente menores a los obtenidos por *C. reinhardtii* CC1731, lo cual es opuesto a lo esperado. Se infiere que esta diferencia es debida a que la microalga *C. reinhardtii* CC137 consta de pared celular, por lo que la presencia de radicales químicos presentes en ésta no permiten una interacción adecuada con el diclofenaco, mientras que *C. reinhardtii* CC1731 al carecer de esta estructura permite con mayor facilidad la unión con el diclofenaco.

**Tabla 12. Porcentaje de remoción de diclofenaco por las microalgas *C. reinhardtii* CC137 y *C. reinhardtii* CC1731 con diferentes concentraciones de carbono, nitrógeno y fósforo.**

Combinación	<i>C. reinhardtii</i> CC137	<i>C. reinhardtii</i> CC1731
	% de remoción	% de remoción
<b>A</b> <b>50C 50N 50P</b>	34.7 <sup>b</sup> ± 0.2	50.3 <sup>a</sup> ± 1.0
<b>H</b> <b>100C 100N 100P</b>	30.5 <sup>b</sup> ± 0.2	43.2 <sup>a</sup> ± 1.1

Valores con letras distintas indican diferencias estadísticamente significativas en el porcentaje de remoción entre microalgas de cada experimento (ANOVA,  $p < 0.05$ . Prueba de Fisher)

Los porcentajes de remoción obtenidos en las combinaciones A y H por *C. reinhardtii* CC137 y CC173 fueron significativamente diferentes a los porcentajes de remoción de las demás microalgas. Esta diferencia en la remoción del diclofenaco puede deberse al medio utilizado ya que el medio TAP contiene una fuente de carbono (ácido acético), en comparación al medio Basal Bold donde es adicionada por aireación (CO<sub>2</sub>). Diversos autores señalan que las diferencias de remoción de compuestos orgánicos pueden deberse a las características específicas de las cepas utilizadas, así como al tamaño celular y el medio donde se propagan (Zhou *et al.*, 2014; Escapa *et al.*, 2017).

Los resultados obtenidos en este trabajo son similares a los reportados por Escapa *et al.* (2017); quienes evaluaron la capacidad de eliminación de diclofenaco después de 10 días por *Chlorella sorokiniana*, *Chlorella vulgaris* y *Scenedesmus obliquus* con una concentración inicial de diclofenaco de 25 µg mL<sup>-1</sup> en el medio de Mann y Myers. Para el caso de *S. obliquus* se removió el 98% de diclofenaco, mientras que en este trabajo se observó un porcentaje de remoción del fármaco del 91% en el medio de cultivo. Para *C. vulgaris* se presentó un caso diferente ya que Escapa *et al.* (2017) alcanzaron un porcentaje de eliminación del 69%, mientras que en nuestro trabajo los porcentajes de eliminación de diclofenaco oscilaron entre el 80 y el 90%;

estas diferencias pueden deberse al tiempo de exposición, la concentración inicial de diclofenaco y la variación de nutrientes en el medio de cultivo.

De Wilt *et al.* (2016) reportaron otro estudio para la remoción de diclofenaco usando la microalga *C. sorokiniana*. El experimento se realizó por lotes durante 23 días evaluando la remoción de una mezcla de fármacos; entre ellos, el diclofenaco. También evaluaron la degradación de los fármacos en cultivos abióticos. Estos autores reportaron un porcentaje de remoción de 40 a 60% de diclofenaco por la microalga; sin embargo, los resultados obtenidos en los cultivos abióticos fueron similares, así concluyeron que la remoción del fármaco en su caso fue por fotodegradación.

Un estudio reportado por Matamoros *et al.* (2015), en donde se usó un consorcio microalgal por 10 días, alcanzó un porcentaje de remoción de 40 a 60% de diclofenaco, concluyendo que la biodegradación por las microalgas y la degradación por la luz fueron los procesos más importantes involucrados para lograr esos porcentajes de remoción.

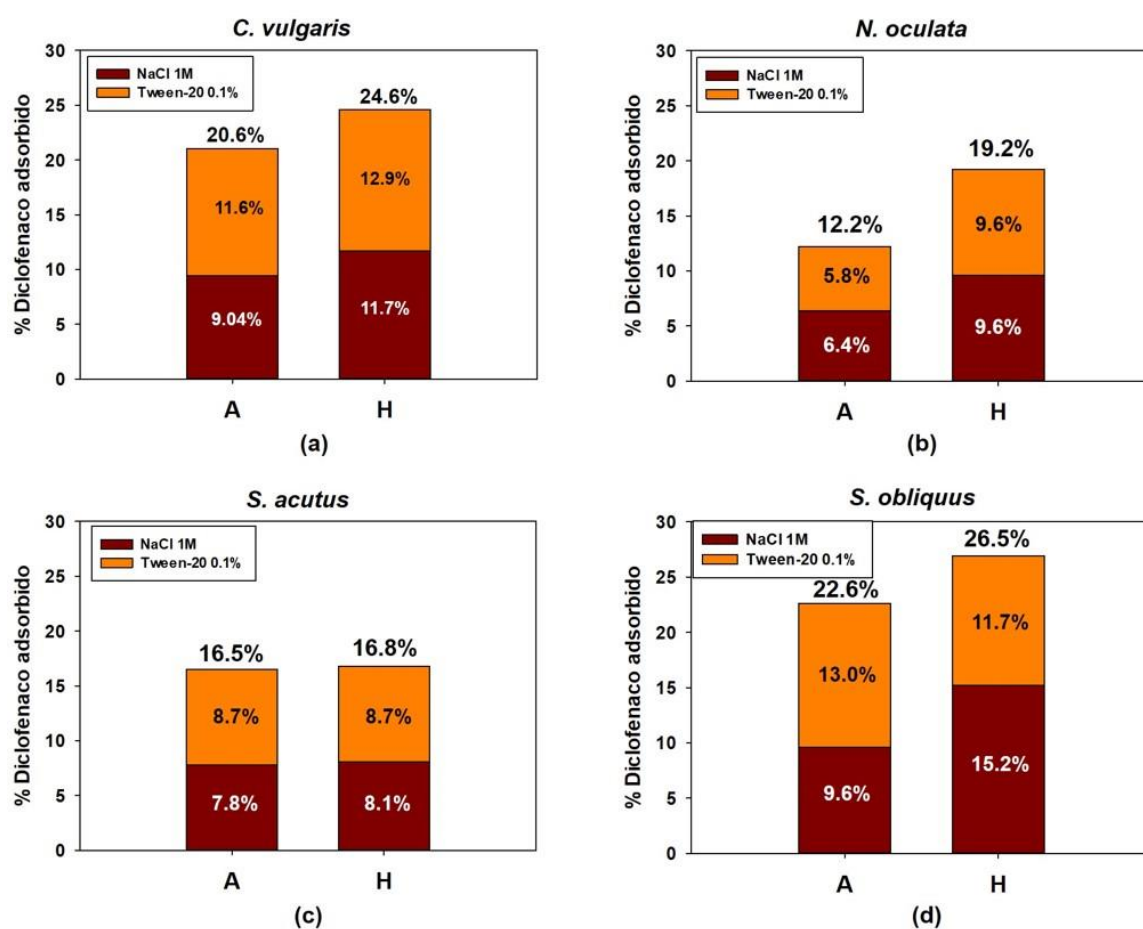
Zhou *et al.* (2014) evaluaron la remoción de compuestos inorgánicos y orgánicos durante 7 días, entre ellos el diclofenaco, con las microalgas *C. reinhardtii*, *C. vulgaris*, *C. pyrenoidosa* y *S. obliquus*. Lograron porcentajes de remoción para diferentes compuestos, entre ellos metales, productos de cuidado personal y productos farmacéuticos; sin embargo, en el caso del diclofenaco, no se obtuvo ninguna remoción. Esto pudo deberse a la competitividad de otros compuestos en el medio que impidieron la captación por las microalgas, por la similitud estructural entre los demás compuestos orgánicos y el diclofenaco o a la formación de complejos insolubles no biodisponibles.

#### **4.1.4. Proceso de remoción de diclofenaco por adsorción a la pared celular**

La cantidad de diclofenaco adsorbido en la pared celular de todas las microalgas al final de la cinética de crecimiento se analizó mediante lavados en dos etapas consecutivas para eliminar las posibles interacciones (electrostáticas e hidrofóbicas) entre el diclofenaco y los componentes de la pared celular. Primero se realiza el lavado con NaCl 1M para discriminar posibles interacciones electrostáticas y después con

Tween-20 al 0.1% para eliminar interacciones hidrofóbicas. Solo se muestran los experimentos 50C 50N 50P y 100C 100N 100P para cada microalga ya que no se observó diferencia significativa en análisis anteriores para las demás combinaciones. Este análisis cuenta con 3 réplicas biológicas.

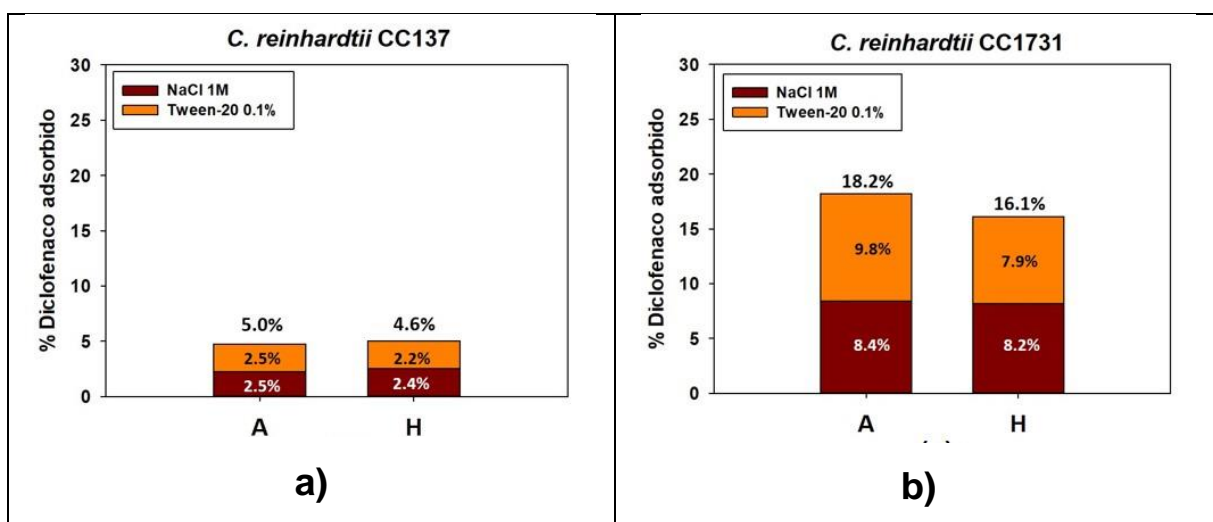
En la Figura 18 se muestran las gráficas correspondientes a la remoción de diclofenaco por adsorción, indicando el porcentaje desorbido por NaCl 1M y por Tween-20 al 0.1% para las microalgas *C. vulgaris*, *N. oculata*, *S. acutus* y *S. obliquus*.



**Figura 18. Efecto de NaCl 1M y Tween-20 al 0.1% en la desorción de diclofenaco de las microalgas *C. vulgaris*, *N. oculata*, *S. acutus* y *S. obliquus*. En las combinaciones A (50C 50N 50P) y H (100C 100N 100P). (ANOVA,  $p < 0.05$ . Prueba de Fisher). La cuantificación del diclofenaco se realizó por HPLC en las condiciones descritas en la metodología.**

*S. obliquus* presentó el mayor porcentaje de adsorción del fármaco, siendo éste de un 26.9% en la combinación H, del cual el 15.2% fue desorbido por NaCl 1M, mientras que el 11.7% fue desorbido con Tween-20 al 0.1%. El menor porcentaje de diclofenaco desorbido se presentó en la combinación A de *N. oculata*, siendo de 12.2%, del cual 6.4% fue desorbido por NaCl 1M y el 5.8% por Tween-20 al 0.1%. Los porcentajes de adsorción no presentan diferencias significativas entre las combinaciones A y H para cada microalga, ni entre las diferentes microalgas. Lo mismo sucede al comparar los porcentajes de diclofenaco desorbido de la pared celular por cada solución.

En la Figura 19 se observan los resultados de la fracción adsorbida de diclofenaco empleando como tratamiento con este fin NaCl 1M y Tween-20 al 0.1% para las microalgas *C. reinhardtii* CC137 y CC1731.



**Figura 19. Efecto de NaCl 1M y Tween-20 al 0.1% en la desorción de diclofenaco de las microalgas a) *C. reinhardtii* CC137 y b) *C. reinhardtii* CC1731.** En las combinaciones A (50C 50N 50P) y H (100C 100N 100P). (ANOVA,  $p < 0.05$ . Prueba de Fisher). La cuantificación del *diclofenaco* se realizó por HPLC en las condiciones descritas en la metodología.

En este caso sí se observa una diferencia significativa entre los porcentajes de fármaco adsorbido en ambas combinaciones para las 2 microalgas, siendo mayor el porcentaje en *C. reinhardtii* CC1731 (Figura 19b). Se observó que la presencia de la pared celular de *C. reinhardtii* CC137 (Figura 19a) hace que la fracción adsorbida del diclofenaco sea menor con respecto a la cepa que carece de ésta. Este resultado es diferente al esperado, ya que los radicales o grupos funcionales de la pared celular deberían incrementar la adsorción con relación a la cepa ausente de esta estructura, al parecer los polímeros estructurales aportan una menor cantidad de grupos al compararlo con los componentes de la membrana celular; probablemente esto es debido a la composición de la membrana celular (lípidos y proteínas) ya que los lípidos crean una barrera semipermeable entre la célula y su entorno, la cual, al ser una estructura fluida y dinámica, permite la difusión de compuestos externos con la ayuda de proteínas integrales y periféricas (Almonte, 2014), adsorbiendo con más eficiencia el diclofenaco, según los resultados obtenidos en este trabajo.

Se observó en los medios de cultivo con la combinación H de las cepas *C. vulgaris*, *N. oculata*, *S. acutus* y *S. obliquus* y la combinación A de *C. reinhardtii* CC1731 y CC137, que se obtuvo un porcentaje mayor de diclofenaco desorbido. Esto sugiere que la eliminación del diclofenaco por el proceso de adsorción está relacionada con la cantidad de biomasa obtenida para cada microalga, ya que corresponden a los experimentos en los que la microalga presentó un mayor crecimiento. Sin embargo, al realizar el análisis estadístico solo se encontró una diferencia significativa en los porcentajes de diclofenaco desorbido de *C. reinhardtii* CC137 con respecto a las demás microalgas en ambas combinaciones.

Los resultados indican que en las 6 microalgas existen interacciones tanto electrostáticas como hidrofóbicas involucradas en la adsorción del diclofenaco y que las proporciones desorbidas por ambos compuestos fueron similares. La adsorción no representa el principal mecanismo de remoción de diclofenaco para las microalgas *C. vulgaris*, *N. oculata*, *S. acutus*, *S. obliquus*, y *C. reinhardtii* CC1731 y CC137 debido al bajo porcentaje obtenido, con respecto a los porcentajes de remoción del fármaco previamente descritos (Tabla 11 y 12).

Los porcentajes de desorción de diclofenaco obtenidos en este trabajo fueron desde 4.6 (*C. reinhardtii* CC137) hasta 26.5% (*S. obliquus*). En un estudio llevado a cabo por de Wilt *et al.* (2016), donde trabajaron con la microalga *C. sorokiniana* reportaron un porcentaje de adsorción de diclofenaco de 5.5 y 7.5%, lo cual contrasta con nuestros resultados con *C. vulgaris*, ya que al ser del mismo género se esperaría un comportamiento similar. Sin embargo, se presenta una gran diferencia en los resultados de este trabajo ya que se obtuvieron porcentajes de 20.6 a 24.6%. En otro estudio realizado por Ben Ouada *et al.* (2019), evaluaron la remoción de diclofenaco por dos algas verdes, *Picocystis* sp. y *Graesiella* sp., ellos reportaron que del porcentaje de remoción obtenido de diclofenaco (25 al 73%) solo se presentó una adsorción inferior al 1%; esta diferencia puede deberse a cambios en los géneros de las microalgas ya que al presentar componentes estructurales diferentes, las interacciones entre las microalgas y el diclofenaco podrían modificarse. La literatura indica que el proceso de adsorción varía significativamente según la hidrofobicidad, estructura y grupos funcionales presentes tanto en los xenobióticos como en la superficie celular de las microalgas (Xiong *et al.*, 2017). En los experimentos realizados, el pH inicial fue de 6.8 para *C. vulgaris*, *N. oculata*, *S. acutus* y *S. obliquus* y de 7.0 para *C. reinhardtii* CC1731 y CC137, al determinar el pH final del experimento; éste aumentó ligeramente a 7.2 y 7.3, respectivamente. Dado que el diclofenaco tiene un valor de pKa de 4.7 (Kamal *et al.*, 2007); al pH inicial de los cultivos (6.8 a 7.0), el diclofenaco estaría cargado negativamente, siendo probable su interacción con radicales básicos presentes en los polisacáridos y proteínas en la pared y membrana celular. En el caso de *N. oculata* se ha establecido que su pared celular contiene algaenos (polímeros altamente alifáticos) (Zhang y Volkman, 2017). Una vez más, si esta situación puede extenderse a las microalgas estudiadas, las moléculas de diclofenaco protonado podrían interactuar hidrofóticamente con estos polímeros, a pesar de la baja proporción de diclofenaco protonado considerando su baja solubilidad en agua (Fini *et al.*, 2012).

Al utilizar NaCl 1M se obtuvo un porcentaje de desorción del 2.4 a 15.1% de diclofenaco, mientras que el porcentaje de desorción por Tween-20 al 0.1% fue de 2.2

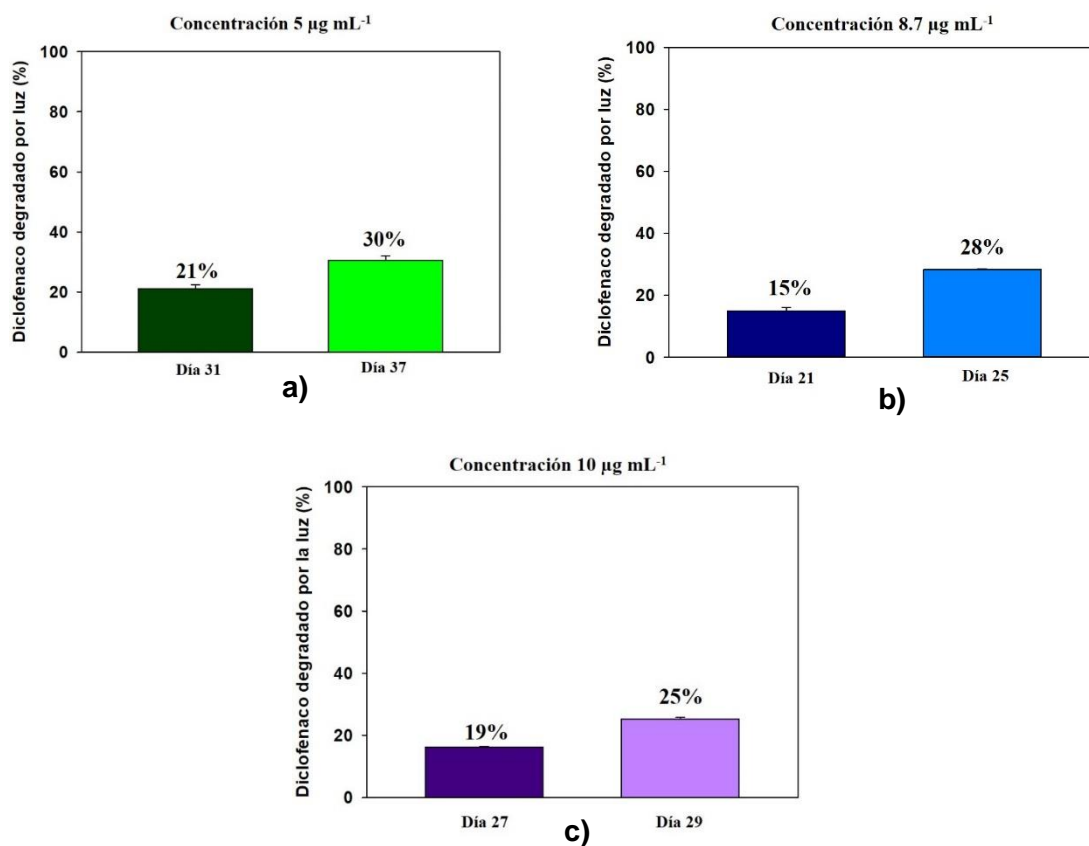
al 13% para las 6 microalgas; sin embargo no se presentó diferencia significativa en la desorción de diclofenaco de las diferentes microalgas. Los resultados obtenidos sugieren que las microalgas utilizadas en este proyecto contienen compuestos estructurales en la pared celular que les permiten realizar interacciones tanto hidrofóbicas como hidrofílicas con el diclofenaco, en menor medida en la microalga *C. reinhardtii* CC137.

El bajo porcentaje de diclofenaco adsorbido en la pared celular de las 6 microalgas indica que otros mecanismos deben estar participando en la remoción del fármaco, como la absorción y la biodegradación del fármaco por actividad de enzimas de secreción liberadas por las microalgas al medio de cultivo. También se podría deber a la actividad de enzimas presentes en el interior de la célula. Según lo reportado en la literatura, las microalgas pueden excretar una serie de sustancias incluyendo sacáridos, proteínas, enzimas o lípidos, las cuales forman una especie de matriz que mantiene a las enzimas extracelulares cerca de la microalga y favorece la degradación de compuestos orgánicos (Xiong *et al.*, 2017)

Desafortunadamente, no existen trabajos suficientes que analicen los mecanismos básicos que emplean las microalgas para absorber y transportar compuestos al citoplasma. La literatura indica que la pared celular de las algas contiene biopolímeros alifáticos llamados alginatos o también denominados esporopoleninas (Schouten *et al.*, 1998; Kodner *et al.*, 2009; Biller *et al.*, 2015). Si bien es cierto que la composición química de la esporopolenina no se conoce con exactitud, existen diversos análisis que revelan que dicho compuesto está conformado por una mezcla de biopolímeros; conteniendo principalmente cadenas largas de ácidos grasos, fenil-propanoides, fenoles y trazas de carotenoides. Estos residuos encontrados en la pared celular de las microalgas interaccionan de manera hidrofóbica con el diclofenaco. Sin embargo, la pared celular contiene también grupos aminos cargados positivamente (provenientes de aminoácidos básicos) lo que le permite interaccionar electrostáticamente con el diclofenaco (González-Torrescano, 2018).

#### 4.1.5. Fotodegradación de diclofenaco

Se evaluó la degradación por fotólisis de diclofenaco en los medios TAP y Basal Bold. Este análisis cuenta con 3 réplicas biológicas. En la Figura 20 se muestra el porcentaje de diclofenaco en el medio de cultivo para las 3 concentraciones estudiadas.



**Figura 20. Fotodegradación de diclofenaco.** Medios de cultivo expuestos a un fotoperiodo de 16 h luz 8 h oscuridad. (a) Concentración de 5 µg mL<sup>-1</sup>. (b) Concentración de 8.7 µg mL<sup>-1</sup>. (c) Concentración de 10 µg mL<sup>-1</sup>. (ANOVA,  $p < 0.05$ . Prueba de Fisher). La cuantificación del diclofenaco se realizó por HPLC en las condiciones descritas en la metodología.

Estos experimentos se realizaron en ausencia de las microalgas para determinar la degradación ocasionada por la luz durante los periodos correspondientes a los días finales de las cinéticas de las microalgas estudiadas. En la Figura 20a se

muestra el porcentaje de degradación de diclofenaco para la concentración inicial de  $5 \mu\text{g mL}^{-1}$ , las muestras fueron tomadas los días 31 y 37, dando como resultado una degradación de 21 y 30%, respectivamente. Para la concentración de  $8.7 \mu\text{g mL}^{-1}$ , se tomó muestra el día 21 y 25, obteniendo una degradación de 15 a 28% (Figura 20b). Mientras que la Figura 20c muestra el resultado del análisis para la concentración inicial de  $10 \mu\text{g mL}^{-1}$ , la muestra se tomó los días 27 y 29, mostrando un porcentaje de degradación de 19 a 25%.

Varios estudios han demostrado que se pueden fotodegradar varios medicamentos ya que generalmente tienen anillos aromáticos, heteroátomos y otros grupos funcionales; permitiendo la absorción de la radiación solar o facilitando reacciones con compuestos fotosensibles presentes en el medio que inducen su fotodegradación (Kunkel y Radke, 2012; Rivera-Utrilla *et al.*, 2013).

Ben-Ouada *et al.* (2019) evaluaron la eliminación de diclofenaco (concentración inicial: 25, 50 y  $100 \mu\text{g mL}^{-1}$ ) en condiciones de cultivo similares a las de este trabajo, donde la fotodegradación no superó el 8% en 5 días, independientemente de las concentraciones iniciales. En otro estudio, llevado a cabo por Zhang *et al.* (2013) se evaluó la remoción de diclofenaco en mesocosmos de *Scirpus validus* creciendo en condiciones de hidroponia y en mesocosmos sin plantas. En los mesocosmos sin plantas se observó un 80% de disminución en la concentración de diclofenaco al cabo de 7 días. Los autores indican que la eliminación de diclofenaco en sistemas acuáticos puede atribuirse principalmente a la fotodegradación.

El porcentaje de eliminación de diclofenaco en las condiciones del cultivo empleadas en el presente trabajo fue menor en comparación con otros estudios donde se obtuvieron mayores porcentajes de degradación. Sin embargo, esto probablemente se debió al tipo de luz (visible) utilizada en este experimento. Generalmente, en los estudios de fotodegradación los compuestos en solución se exponen a una fuente de luz ultravioleta (Zhang *et al.*, 2011; Zhang *et al.*, 2013; Matamoros *et al.*, 2008). Además del tipo de luz, Zhang *et al.* (2011) evaluaron el efecto de iones nitrato (0.01, 0.1 y 1.0 mM) en la fotodegradación del diclofenaco y concluyeron que ésta se reduce por la presencia de iones nitrato en el medio, mientras más concentración de iones

menor fotodegradación del fármaco. Lo anterior justifica los bajos porcentajes de fotodegradación de diclofenaco obtenidos en este trabajo ya que nuestro medio de cultivo estudiado tiene una concentración inicial de 2.94 mM de iones nitrato.

Diversos autores han reportado que el diclofenaco puede interaccionar con compuestos del medio en presencia de luz, formando complejos que podrían absorber a diferente longitud de onda que el fármaco en su forma libre (Encinas *et al.*, 1998; Packer *et al.*, 2003; Zhang *et al.*, 2017; Wu *et al.*, 2019). Lo anterior concuerda con lo observado en este trabajo, a pesar de que las condiciones de experimentación son diferentes (Intensidad y duración de luz, pH y composición del medio), se presentó una degradación del diclofenaco solo en presencia de luz, mientras que en los experimentos control (sin microalgas y sin luz) no se observó cambio en la concentración inicial del diclofenaco, por lo que se infiere que el fármaco está interactuando con compuestos del medio.

Los porcentajes obtenidos en este análisis sin microalgas (fotodegradación), no pueden ser comparados con los obtenidos en los experimentos de remoción de diclofenaco por microalgas, ya que la incidencia de la luz no es la misma. Se ha reportado que la fotodegradación de compuestos puede verse afectada por diversos factores; entre ellos, la atenuación de la radiación de luz en el medio debido a los compuestos orgánicos disueltos, en este caso debido a las microalgas, las cuales pueden interferir entre la luz y el diclofenaco (Poiger, Buser y Muller, 2009). Se infiere que sí existe degradación del fármaco por fotólisis aun en presencia de microalgas, pero no se puede calcular de manera precisa la fracción de fotodegradación del diclofenaco en las condiciones de cultivo.

## CAPITULO V

### 5.1. CONCLUSIONES

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

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

## CAPITULO VI

### 6.1. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

- Acosta, K. L. (2010). Biodegradación de contaminantes emergentes en columnas empacadas con suelos del Valle de Tula. [Tesis de maestría, Universidad Autónoma de México].
- Aguirre, N., Palacio, J., Correa, I. & Hernández, E. (2007). Ensayos de bioestimulación algal con diferentes relaciones nitrógeno-fósforo, bajo condiciones de laboratorio. *Revista Ingenierías*, 6(11), 11-21. Recuperado de: <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=75061102>
- Ajayan, K. V., Selvaraju, M., Unnikannan, P., & Sruthi, P. (2015). Phycoremediation of tannery wastewater using microalgae *Scenedesmus* species. *International Journal of Phytoremediation*, 17(10), 907–916. doi: 10.1080/15226514.2014.989313
- Almonte, L. F. (2014). Estudio de interacciones electrostáticas de biomoléculas en medio líquido por microscopía y espectroscopía de fuerzas. [Tesis de doctorado, Universidad Autónoma de Madrid].
- Amaya, A. E. & Sarmiento, R. J. (2010). Desarrollo de una metodología para la extracción de aceite de microalgas con etanol/hexano empleando disrupción celular térmica y química. [Tesis de licenciatura, Universidad Industrial de Santander].
- Arrieta, E. R. (2008). Aplicaciones biotecnológicas de las microalgas. *Revista del Colegio de Microbiólogos y Químicos Clínicos de Costa Rica*, 14 (1), 1-6.
- aus der Beek, T., Weber, F.A., Bergmann, A., Hickmann, S., Ebert, I., Hein, A. & Küster, A. (2016). Pharmaceuticals in the environment-Global occurrences and perspectives. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 35(4), 823–835. doi: 10.1002/etc.3339
- Baker, A. L. (2012). Phycokey -- an image based key to Algae (PS Protista), Cyanobacteria, and other aquatic objects. University of New Hampshire Center

for Freshwater Biology. Recuperado de:

<http://cfb.unh.edu/phycokey/phycokey.htm>

- Ballen-Segura, M., Hernández Rodríguez, L., Parra Ospina, D., Vega Bolaños, A. & Pérez, K. (2016) Using *Scenedesmus* sp. for the phycoremediation of Tannery wastewater. *Tecciencia*, 11(21), 69–75. doi: 10.18180/tecciencia.2016.21.11
- Barajas, A. F., Godoy, C. A., Monroy, J. D., Barajas, C. & Kafarov, V. (2012). Mejoramiento del secuestro del CO<sub>2</sub> por *Chlorella vulgaris* UTEX 1803 en fotobiorreactores a escala laboratorio. *Revista ION*, 25 (2), 39-47. Recuperado de: <https://www.redalyc.org/articulo.oa?id=342030286005>
- Barsanti, L. & Gualtieri, P. (2014). *Algae: anatomy, biochemistry and biotechnology*. Florida: CRC press.
- Behera, S. K., Kim, H. W., Oh, J. E. & Park, H. U. (2011). Occurrence and removal of antibiotics, hormones and several other pharmaceuticals in wastewater treatment plants of the largest industrial city of Korea. *Science and Total Environment*, 409 (20), 4351-4360. doi: 10.1016/j.scitotenv.2011.07.015
- Ben-Ouada, S., Ben-Ali, R., Cimetiere, N., Leboulanger, C., Ben-Ouada, H. & Sayadi, S., (2019). Biodegradation of diclofenac by two green microalgae: *Picocystis* sp. y *Graesiella* sp. *Ecotoxicology and Environmental Safety*. 186(2019), 109769. doi: 10.1016/j.ecoenv.2019.109769
- Benavente-Valdés, J. R., Montañez, J. C., Aguilar, C. N. & Méndez-Zavala, A. (2012) Tecnología de cultivo de microalgas en fotobiorreactores, *Revista Científica de la Universidad Autónoma de Coahuila*. 4(7).
- Bermeo, L. (2011). Estudio del cosechado de cultivos de microalgas en agua residual mediante técnicas de centrifugado. [Tesis de pregrado, Universidad de Cádiz].
- Bhatnagar, A., Chinnasamy, S., Singh, M. & Das, K. C. (2011). Renewable biomass production by mixotrophic algae in the presence of various carbon sources and wastewaters. *Applied Energy*, 88, 3425–3431. doi: 10.1016/j.apenergy.2010.12.064

- Biller, P., Ross, A. B. & Skill, S. C. (2015) Investigation of the presence of an aliphatic biopolymer in cyanobacteria: Implications for kerogen formation. *Organic Geochemistry*, 81, 64-69. doi: 10.1016/j.orggeochem.2015.01.010
- Bolier, G. & Donze, M. (1989) On the accuracy and interpretation of growth curves of planktonic algae. *Hydrobiologia*, 188–189, 175–179. doi: 10.1007/BF00027783
- Bolling, C. & Fiehn, O. (2005). Metabolite profiling of *Chlamydomonas reinhardtii* under nutrients deprivation. *Plant Physiology*, 139 (4), 1995-2005. doi: 10.1104/pp.105.071589
- Bolong, N., Ismail, A. F., Salim, M. R. & Matsuura, T. (2009). A review of the effects of emerging contaminants in wastewater and options for their removal. *Desalination*, 239(1-3), 229-246. doi: 10.1016/j.desal.2008.03.020
- Bonnefille, B., Courant, F. & Gomez, E. (2018). Diclofenac in the marine environment: A review of its occurrence and effects. *Marine Pollution Bulletin*, 131(Part A), 496-506. doi: 10.1016/j.marpolbul.2018.04.053
- Boom, A., Sinnige, J. S. & de Leeuw, J. W. (2005). Cutan, a common aliphatic biopolymer in cuticles of drought-adapted plants. *Organic Geochemistry Journal*, 36, 595–601. doi: 10.1016/j.orggeochem.2004.10.017
- Brönmark, C. & Hansson, L. A. (2005) *The Biology of Lakes and Ponds*. Oxford: University Press.
- Bui, T. & Choi, H. (2010). Influence of ionic strength, anions, cations, and natural organic matter on the adsorption of pharmaceuticals to silica. *Chemosphere*, 80(7), 681-686. doi: 10.1016/j.chemosphere.2010.05.046
- Butusov, M. & Jernelöv, A. (2013) *Phosphorus in the Organic Life: Cells, Tissues, Organisms..* New York: Springer,
- Cai, T., Park, S. Y. & Li, Y. (2013). Nutrient recovery from wastewater streams by microalgae: Status and prospects, *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 19, 360–369. doi: 10.1016/j.rser.2012.11.030
- Carmona, A. D. (2012). Estudio de absorción de anti-inflamatorios no esteroideos en plantas de trigo y adsorción en suelos de la región metropolitana. [Tesis de licenciatura, Universidad de Chile].

- Catalá, L. (2013). Contribución al estudio del crecimiento y las posibilidades del aprovechamiento termoquímico de las microalgas *Nannochloropsis Gaditana* y *Nannochloropsis Oculata*. [Tesis de doctorado, Universidad de Alicante].
- Chacón, C., Andrade, C., Cárdenas, C., Araujo, I., & Morales, E. (2004). Uso de *Chlorella sp.* y *Scenedesmus sp.* en la remoción de nitrógeno, fósforo y DQO de aguas residuales urbanas de Maracaibo, Venezuela. *Boletín del centro de investigaciones biológicas*, 38 (2). Recuperado de: <http://www.produccioncientificaluz.org/index.php/boletin/article/view/26>
- Cid, A. (2015). Toxicidad ejercida por el triclosán sobre la microalga dulceacuícola *Chlamydomonas moewusii* Gerloff. [Tesis de licenciatura, Universidad de Coruña].
- Cleuvers M. (2003). Aquatic ecotoxicity of pharmaceuticals including the assessment of combination effects. *Toxicology Letters*, 142(3), 185-194. doi: 10.1016/S0147-6513(03)00141-6
- Cleuvers, M. (2014). Mixture toxicity of the anti-inflammatory drugs diclofenac, ibuprofen, naproxen and acetylsalicylic acid. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 59, 309–315. doi: 10.1016/S0147-6513(03)00141-6
- Corbacho, A. (2018). Eliminación de contaminantes emergentes en agua residual para su posterior reutilización. [Tesis doctoral, Universidad de Cádiz].
- Cota, K. M. (2019). Efecto de la limitación de nutrientes en la composición bioquímica de *Ettlia oleabundans* y su potencial en la producción de compuestos de alto valor agregado. [Tesis de Maestría, Centro de Investigaciones Biológicas del Noreste, S.C.].
- Cruz-Guzmán, M. (2007). *La contaminación de suelos y aguas. Su prevención con nuevas sustancias naturales*. Sevilla: Editorial Universidad de Sevilla-Secretariado de Publicaciones.
- De Wilt, A., Butkovski, A., Tuantet, K., Hernández, L., Fernandes, T. V., Langenhoff, A. & Zeeman, G. (2016). Micropollutant removal in an algal treatment system fed with source separated wastewater streams. *Journal of Hazardous Materials*, 304, 84-92. doi: 10.1016/j.jhazmat.2015.10.033

- Dietrich, D. R. & Prietz, A. (1999). Fish embryotoxicity and teratogenicity of pharmaceuticals, detergents and pesticides regularly detected in sewage treatment plant effluents and surface waters. *Toxicologist*, 48(1-S), 151.
- Dietz, A. & Schnoor, J. (2001). Advances in phytoremediation. *Environmental Health Perspectives*, 109(1), 163-168. doi: 10.1289/ehp.01109s1163
- Ding, T., Yang, M., Zhang, J., Yang, B., Lin, K., Li, J. & Gan, J. (2017). Toxicity, degradation and metabolic fate of ibuprofen on freshwater diatom *Navicula sp.* *Journal of Hazardous Materials*, 330, pp. 127-134. doi: 10.1016/j.jhazmat.2017.02.004
- Dougherty, J., Swarzenski, P., Dinicola, R. & Reinhard, M. (2010). Occurrence of herbicides and pharmaceutical and personal care products in surface water and groundwater around Liberty Bay, Puget Sound, Washington. *Journal of Environmental Quality*, 39(4), 1173-1180. doi: 10.2134/jeq2009.0189
- Ebele, A. J., Abou-Elwafa Abdallah, M. & Harrad, S. (2017). Pharmaceuticals and personal care (PPCPs) in the freshwater aquatic environment. *Emerging Contaminants*, 3(1), 1-16. doi: 10.1016/j.emcon.2016.12.004
- Emparan, Q., Jye, Y. S., Danquah, M. K. & Harun, R. (2020). Cultivation of *Nannochloropsis sp.* microalgae in palm oil mill effluent (POME) media for phycoremediation and biomass production: Effect of microalgae cells with and without beads. *Journal of water Process Engineering*, 33, 101043. doi: 10.1016/j.jwpe.2019.101043
- Encinas, S., Bosca, F. & Miranda, M. A. (1998). Photochemistry of 2,6-Dichlorodiphenylamine and 1-Chlorocarbazole, the photoactive chromophores of diclofenac, meclofenamic acid and their major photoproducts. *Photochemistry and Photobiology*, 68, 640-645. doi: 10.1111/j.1751-1097.1998.tb02523.x
- Escapa, C., Nuno, R., Paniagua, S., García, A. & Otero, M. (2017). Comparative assessment of pharmaceutical removal from wastewater by the microalgae *Chlorella sorokiniana*, *Chlorella vulgaris* y *Scenedesmus obliquus*. *Biological Wastewater Treatment and Resource Recovery*, Robina Farooq and Zaki Ahmad. *IntechOpen*, 99–117. doi: 10.5772/66772

- Fan, L. H., Zhang, Y. T., Zhang, L. & Chen, H. L. (2008). Evaluation of a membrane-sparged helical tubular photobioreactor for carbon dioxide biofixation by *Chlorella Vulgaris*. *Journal of Membrane Science*, 32 (1) 336-345. doi: 10.1016/j.memsci.2008.07.044
- Farré, La M., Pérez, S., Lantiani, L. & Barceló, D. (2008). Fate and toxicity of emerging pollutants, their metabolites and transformation products in the aquatic environment. *Trends in Analytical Chemistry*, 27(11), 991-1007. doi: 10.1016/j.trac.2008.09.010
- Fatta-Kassinos D., Hapeshi E., Achilleos A., Meric S., Gros M., Petrovic M. & Barcelo D. (2011). Existence of pharmaceutical compounds in tertiary treated urban wastewater that is utilized for reuse applications. *Water Resources Management*, 25(4), 1183-1193. doi: 10.1007/s11269-010-9646-4
- Fawley, K. P. (2007). Observations on the diversity and ecology of freshwater *Nannochloropsis* (*Eustigmatophyceae*), with descriptions of new taxa. *Protist*, 158(3), 325-336. doi: 10.1016/j.protist.2007.03.003
- Ferreira, V. S., Rocchetta, L., Conforti, V., Bench, S., Feldman, R. & Levin, M. (2007). Gene expression patterns in *Euglena gracilis*: Insights into the cellular response to environmental stress. *Gene*, 389(2), 136-145. doi: 10.1016/j.gene.2006.10.023
- Fini, A., Bassini, G., Monastero, A. & Cavallari, C., (2012). Diclofenac salts, VIII. Effect of the counterions on the permeation through porcine membrane from aqueous saturated solutions. *Pharmaceutics* 4, 413-429. doi: 10.3390/pharmaceutics4030413
- Flemming, H. C. & Wingender, J. (2010). The biofilm matrix. *Nature Reviews Microbiology*, 8, 623-633. doi: 10.1038/nrmicro2415
- Foflonker, F., Ananyev, G., Qiu, H., Morrison, A., Palenik, B., Dismukes, G. C. & Bhattacharya, D. (2016). The unexpected extremophile: Tolerance to fluctuating salinity in the green alga *Picochlorum*. *Algal Research*, 16, 465-472. doi: 10.1016/j.algal.2016.04.003

- Forján Lozano, E., Vílchez Lobato, C. & Vega Piqueres, J. M. (2014) *Bioteconología de microalgas*. España: Ed. Eduardo Forjan Lozano.
- García, R. (2014). Producción de biomasa de microalgas rica en carbohidratos acoplada a la eliminación fotosintética de CO<sub>2</sub>. [Tesis de doctorado, Universidad de Sevilla].
- Gelin, F., Volkman, J. K., deLeeuw, J. W. & Damsté, J. S. (1997). Mid-chain hydroxy long-chain fatty acids in microalgae from the genus *Nannochloropsis*. *Phytochemistry*, 45(4), 641–646. doi: 10.1016/S0031-9422(97)00068-X
- Gerbaldo, M., Crivello, M., Mendieta, S. & Elías, V. (2019). Degradación de contaminantes emergentes presentes en efluentes acuáticos, empleando catalizadores tipo ferritas. *Actas de Jornadas y Eventos Académicos de Universidad Tecnológica Nacional*, 4. doi: 10.33414/ajea.4.383.2019
- González, S., Müller, J., Petrovic, M., Barceló, D. & Knepper T. P. (2006). Biodegradation studies of selected priority acidic pesticides and diclofenac in different bioreactors. *Environmental Pollution*, 144(3), 926-932. doi: 10.1016/j.envpol.2006.02.021
- Gonzalez-Gonzalez, L. M. (2010). Influencia de la deficiencia de nitrógeno y fósforo en las interacciones competitivas entre *Chlorella vulgaris* y *Scenedesmus acutus*. [Tesis de Maestría, Universidad Nacional de Colombia].
- Gonzalez-Torrescano, M. (2018). Evaluación de la remoción de diclofenaco por un consorcio microalgal. [Tesis de Licenciatura, Universidad Autónoma de San Luis Potosí].
- Griesbeck, C., Kobl, I. & Heitzer, M. (2006). *Chlamydomonas reinhardtii*. A protein expression system for pharmaceutical and biotechnological proteins. *Molecular biotechnology*, 34(2), 213-223. doi: 10.1385/MB:34:2:213
- Grobbelaar, J. U. (2004). *Algal nutrition, mineral nutrition*. Oxford: Blackwell Publishing.
- Gröner, F., Höhne, C., Kleiner, W. & Kloas, W. (2017). Chronic diclofenac exposure affects gill integrity and pituitary gene expression and displays estrogenic activity in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Chemosphere*, 166, 473-481. doi: 10.1016/j.chemosphere.2016.09.116

- Grzesiuk, M., Wacker, A. & Spijkerman, E. (2016). Photosynthetic sensitivity of phytoplankton to common used pharmaceuticals and its dependence on cellular phosphorus status. *Ecotoxicology*, 25, 697-707. doi: 10.1007/s10646-016-1628-8
- He, B. S., Wang, J., Liu, J. & Hu, X. M. (2017). Eco-pharmacovigilance of non-steroidal antiinflammatory drugs: Necessity and opportunities. *Chemosphere*, 181, pp. 178-189. doi: 10.1016/j.chemosphere.2017.04.084
- Heberer, T. (2002). Tracking persistent pharmaceutical residues from municipal sewage to drinking water. *Journal of Hydrology*, 266(3-4), 175-189. doi: 10.1016/S0022-1694(02)00165-8
- Henriques, M., Silva, A. & Rocha, J. (2007). Extraction and quantification of pigments from a marine microalga: a simple and reproducible method. *Communicating Current Research and Educational Topics and Trends in Applied Microbiology Formatex*, 586-593.
- Hernández-Pérez, A. & Labbé, J. I. (2014). Microalgas, cultivos y beneficios. *Revista de Biología Marina y Oceanografía*, 49(2), 157-173. doi: 10.4067/S0718-19572014000200001
- Hu, H. & Gaol, K. (2003). Optimization of growth and fatty acid composition of a unicellular marine picoplankton, *Nannochloropsis sp.*, with enriched carbon sources. *Biotechnology Letters*, 25: 421–425. doi: 10.1023/A:1022489108980
- Hun-Arenas, Y. C. (2010). Efecto de la concentración de la solución nutritiva sobre la biomasa de microalgas del género *Chlamydomonas*. [Tesis de Licenciatura, Universidad de Chile].
- Institute of Hidrobiology (2013). Freshwater Algae Culture Collection. Recuperado de: <http://algae.ihb.ac.cn/english/algaeDetail.aspx?id=186>
- IWW (2014). Pharmaceuticals in the environment: Occurrence, effects, and options for action. Alemania: German Environment Agency. Recuperado de: [https://www.umweltbundesamt.de/sites/default/files/medien/378/publikationen/pharmaceuticals\\_in\\_the\\_environment\\_0.pdf](https://www.umweltbundesamt.de/sites/default/files/medien/378/publikationen/pharmaceuticals_in_the_environment_0.pdf)

- Jeffree, C. E. (2007). The fine structure of the plant cuticle. *Annual plant reviews*, 23, 11–125. doi: 10.1002/9780470988718.ch2
- Kamal, M.A., Imura, N., Nabekura, T. & Kitagawa, S., (2007). Enhanced skin permeation of diclofenac by ion-pair formation and further enhancement by microemulsion. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*, 55(3), 368-371. doi: 10.1248/cpb.55.368
- Karlson, B., Andreasson, A., Johansen, M., Karlberg, M., Loo, A. & Skjevik, AT. (2020). Nordic Microalgae. *Publicación electrónica mundial*. Recuperado de: <http://nordicmicroalgae.org>
- Khozin-Goldberg, I. & Cohen, Z. (2006). The effect of phosphate starvation on the lipid and fatty acid composition of the fresh water eustigmatophyte *Monodus subterraneus*. *Phytochemistry*, 67, 696-701. doi: 10.1016/j.phytochem.2006.01.010
- Kodner, R. B., Summons, R. E. & Knoll, A. H. (2009). Phylogenetic investigation of the aliphatic, non-hydrolyzable biopolymer algaenan, with a focus on green algae. *Organic Geochemistry*, 40(8), 854-862. doi: 10.1016/j.orggeochem.2009.05.003
- Kojima, H. & Lee K. (2001). *Photosynthetic microorganisms in Environmental Biotechnology*. Hong-Kong: Springer-Verlag.
- Kumar S. K., Dahms H. U., Won E. J., Lee J. S. & Shin K. H. (2015). Microalgae- A promising tool for heavy metal remediation. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 113, 329-352. . doi: 10.1016/j.ecoenv.2014.12.019
- Kûmmerer, K. (2008). Pharmaceuticals in the environment – a brief summary. Pharmaceuticals in the environment – Sources, fate, effects and risks. *Springer-Verlag*. 1-21. doi: 10.1007/978-3-662-09259-0
- Kunkel, U. & Radke, M. (2012). Fate of pharmaceuticals in rivers: Deriving a benchmark dataset at favorable attenuation conditions. *Water Reserch*, 46, 5551-5565. doi: 10.1016/j.watres.2012.07.033
- Lee, J., Ji, K., Lim Kho, Y., Kim, P. & Choi, K. (2011). Chronic exposure to Diclofenac on two freshwater cladocerans and *Japanese medaka*. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 74(5), 1216-25. doi: 10.1016/j.ecoenv.2011.03.014

- Lee, Y. K. & Kojima, H. (2001). *Photosynthetic microorganisms in environmental biotechnology*. Berlin: Springer Berlin Heidelberg
- León-Saiki, G. M. L. (2018). Role of starch in *Tretradesmus obliquus*. [Tesis doctoral, Wageningen University].
- Li, Q.C., Fu, L., Wang, Y., Zhou, D.D. & Rittmann, B.E. (2018). Excessive phosphorus caused inhibition and cell damage during heterotrophic growth of *Chlorella regularis*. *Bioresource Technology*, 268, 266-270. doi: 10.1016/j.biortech.2018.07.148
- Liang, Y., Sarkany, N. & Cui, Y. (2009). Biomass and lipid productivities of *Chlorella vulgaris* under autotrophic, heterotrophic and mixotrophic growth conditions. *Biotechnology Letter*, 31, 1043–1049. doi: 10.1007/s10529-009-9975-7
- Liu, Y., Guan, Y.T., Gao, Q.T., Tam, N.F.Y. & Zhu, W.P. (2010). Cellular responses, biodegradation and bioaccumulation of endocrine disrupting chemicals in marine diatom *Navicula incerta*. *Chemosphere*, 80(5), 592-599. doi: 10.1016/j.chemosphere.2010.03.042
- Lonappan, L., Kaur Brar, S., Kumar Das, R., Verma, M. & Surampalli, R. (2016). Diclofenac and its transformation products: environmental occurrence and toxicity- A review. *Environmental International*, 96, 127-138. doi: 10.1016/j.envint.2016.09.014
- López, A. R. (2014). Producción de lactostatina en cloroplastos de *Chlamydomonas reinhardtii*. [Tesis de maestría, Universidad Autónoma de Aguascalientes].
- Loreto, C., Rosales, N., Bermudez, J. & Morales, E. (2003). Pigment and protein production of cyanobacterium *Anabaena* pcc 7120 in relation to nitrogen concentration and irradiance. *Gayana Botanica*, 60(2), 83-89. doi: 10.4067/S0717-66432003000200001
- Lubián, L. M. (1982). Ultraestructura y pigmentos de algunas Chlorophyceae y Eustigmatophyceae planctónicas de morfología similar. *Collectanea botánica*, 13(2), 873-880.
- Luo, Y., Guo, W., Hao, H., Duc, L., Ibney, F., Zhang, J., Liang, S. & Wang, X. (2014). A review on the occurrence of micropollutants in the aquatic environment and

- their fate and removal during wastewater treatment. *Science of the Total Environment*, 473-474, 619-641. doi: 10.1016/j.scitotenv.2013.12.065
- Maes, H. M., Maletz, S. X., Ratte, H. T., Hollender, J. & Schaeffer, A. (2014). Uptake, Elimination, and Biotransformation of 17 $\alpha$ -Ethinylestradiol by the Freshwater Alga *Desmodesmus subspicatus*. *Environmental Science and Technology*, 48(20), 12354-12361. doi: 10.1021/es503574z
- Majewska, M., Harshkova, D., Gusciora, M. & Aksmann, A. (2018). Phytotoxic activity of diclofenac: Evaluation using a model green alga *Chlamydomonas reinhardtii* with atrazine as a reference substance. *Chemosphere*, 2019, 989-997. doi: 10.1016/j.chemosphere.2018.06.156
- Maldonado-Barraza, C. R. (2011). Inducción lipídica por limitación de nutrientes en las microalgas *Scenedesmus dimorphus* y *Chlorella sorokiniana*. [Tesis de Maestría, Centro de investigación en materiales avanzados, S. C.].
- Malla, A. C. & Saula, S. V. (2015). Determinación del metabolito tóxico Aflatoxina M<sub>1</sub> en leches cruda, pasteurizada y ultrapasteurizada consumidas en la ciudad de cuenca mediante la técnica de cromatografía líquida de alta resolución (HPLC). [Tesis de licenciatura, Universidad de Cuenca].
- Markou, G. & Georgakakis, D. (2011). Cultivation of filamentous cyanobacteria (blue-green algae) in agro-industrial wastes and wastewaters: A review. *Reviews in Environmental Science and Biotechnology*, 12(2), 119-130. doi: 10.1016/j.apenergy.2010.12.042
- Martínez, C., Blanco, G., García, E. & Agúndez, J. (2006). Farmacogenómica clínica de CYP2C8 y CYP2C9: conceptos generales y aplicación al uso de AINE. *Farmacia Hospitalaria*, 30(4), 240-248. doi: 10.1016/S1130-6343(06)73982-4
- Martínez, M., Sánchez, S., Jiménez, J. & Muñoz, L. (2000). Nitrogen and phosphorus removal from urban wastewater by the microalga *Scenedesmus obliquus*. *Bioresource Technology*, 73, 263-272. doi: 10.1016/j.btre.2016.04.003
- Martínez, S. (2018). Estudio del efecto citotóxico ejercido por el diclofenaco sobre las microalgas *Chlamydomonas reinhardtii* y *Phaeodactylum tricornutum*. [Tesis de Maestría. Universidad de La Coruña].

- Matamoros, V., García, J. & Bayona, J. M. (2008). Organic micropollutant removal in a full-scale surface flow constructed wetland fed with secondary effluent. *Water Research*, 42, 653-660. doi: 10.1016/j.watres.2007.08.016
- Matamoros, V., Gutierrez, R., Ferrer, I., García, J. & Bayona, J. (2015). Capability of microalgae-based wastewater treatment systems to remove emerging organic contaminants: A pilot-scale study. *Journal of Hazardous Materials*, 288(2015), 34-42. doi: 10.1016/j.jhazmat.2015.02.002
- McCutcheon, S. & Schnoor, J. (2003). Overview of phytotransformation and control of wastes. *Phytoremediation: Transformation and control of contaminants*. Wiley, New York. 3-58 pp. doi: 10.1002/047127304X.ch1
- McGettigan, P. & Henry, D. (2013). Use of non-steroidal anti-inflammatory drugs that elevate cardiovascular risk: an examination of sales and essential medicines lists in low-, middle-, and high- income countries. *PLoS Medicine*, 10(2), e1001388. doi: 10.1371/journal.pmed.1001388
- Mehrabadi, A., Craggs, R. & Farid, M. (2015). Tratamiento de aguas residuales de alta tasa de estanques de algas (WWT HRAP) para la producción de biocombustibles de bajo costo. *Bioresource Technology*, 184, 202-214. doi: 10.1016/j.biortech.2014.11.004
- Meng, X., Yang, X., Xu, X., Zhang, L., Nie, Q. & Xian, M. (2009). Biodiesel production from oleaginous microorganisms. *Renewable Energy*, 34(1), 1-5. doi: 10.1016/j.renene.2008.04.014
- Montes, J. P. & Pulido, M. (2012). Obtención de protocolos para el aislamiento, cultivo y extracción de ADN de *Chlorella vulgaris* Beyerinck. *El astrolabio*, 11(2), 47-54.
- Morales, N. X. (2012). Estudio del efecto de la incorporación de biosólidos sobre la movilidad de anti-inflamatorios no esteroideos en suelos de la Región Metropolitana. [Tesis de licenciatura, Universidad de Chile].
- Moro, I., Matozzo, V., Piovan, A., Moschin, E. & Vecchia, F. D. (2014). Morphophysiological effects of ibuprofen in *Scenedesmus rubescens*. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 38 (2), 379-387. doi: 10.1016/j.etap.2014.06.005

- Moronta, R., Mora, R. & Morales, E. (2006). Respuesta de la microalga *Chlorella sorokiniana* al pH, salinidad y temperatura en condiciones axénicas y no axénicas. *Revista de la Facultad de Agronomía de la Universidad de Zulia.*, 23(1), 28-43.
- Mus, F., Dubini, A., Seibert, M., Posewitz, M. C. & Grossman, A. R. (2007). Anaerobic acclimation in *Chlamydomonas reinhardtii*: Anoxic gene expression, hydrogenase induction, and metabolic pathways. *Journal of Biological Chemistry*, 282(35), 25475-25486. doi: 10.1074/jbc.M701415200
- Nájera, H. A., Miceli, A. S., Rojas, M. N., Quintero, L. I. & Orantes, C. (2014). Revisión de tecnologías para el tratamiento de aguas residuales incluyendo algunos fármacos. *Innovación y desarrollo*, 3, 73-95. doi: 10.31644/IMASD.5.2014.a04
- Narang, A. & Pilyugin, S. (2005). Towards an integrated physiological theory of microbial growth: from subcellular variables to population dynamics. *Mathematical Biosciences and Engineering*, 2, 173-210.
- Navarro-Aviñón, J., Aguilar, I. & López, J. (2007). Aspectos bioquímicos y genéticos de tolerancia y acumulación de metales pesados en plantas. *Revista científica de ecología y medio ambiente*, 16(2), 10-25. Recuperado de: <https://www.redalyc.org/articulo.oa?id=540/54016203>
- Nicolaou, A., Meric, S. & Fatta, D. (2007). Occurrence pattern of pharmaceuticals in water and wastewater environments. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 387(4), 1225-1234. doi: 10.1007/s00216-006-1035-8
- Oaks, J. L., Gilbert, M., Virani, M. Z., Watson, R. T., Meteyer, C. U., Rideout, B. A., Shivaprasad, H. L., Ahmed, S., Chaudhry, M. J. I., Arshad, M., Mahmood, S., Ali, A. & Khan A. A. (2004). Diclofenac residues as the cause of vulture population decline in Pakistan. *Nature*, 427(6975), 630-633. doi: 10.1038/nature02317
- Olivares, E. (2010). Producción de aceite para usos industriales a partir de la microalga "*Scenedesmus obliquus*". [Tesis de licenciatura, Universidad de El Salvador].

- Otto, B. & Schlosser, D. (2014). First laccase in green algae: purification and characterization of an extracellular phenol oxidase from *Tetracystis aeria*. *Planta*, 240, 1225-1236. doi: 10.1007/s00425-014-2144-9
- Packer, J. L., Werner, J. J., Latch, D. E., McNeill, K. & Arnold, W. A. (2003). Photochemical fate of pharmaceuticals in the environment: naproxen, diclofenac, clofibrac acid, and ibuprofen. *Aquatic Science - Research Across Boundaries*, 65, 342-351. doi: 10.1007/s00027-003-0671-8
- Pal, D., Khozin-Goldberg, I., Cohen, Z. & Boussiba, S. (2011). The effect of light, salinity, and nitrogen availability on lipid production by *Nannochloropsis* sp. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 90(4), 1429–1441. doi: 10.1007/s00253-011-3170-1
- Parkinson, A., & Ogilvie, B. (2008). *Biotransformation of xenobiotics*. New York: Ed. McGraw-Hill.
- Peng, F. Q., Ying, G. G., Yang, B., Liu, S., Lai, H. J., Chen, Z. F. & Zhou, G. J. (2014). Biotransformación of progesterone and norgestrel by two freshwater microalgae (*Scenedesmus obliquus* and *Chlorella pyrenoidosa*): Transformation kinetics and products identification. *Chemosphere*, 95, 581-588. doi: 10.1016/j.chemosphere.2013.10.013
- Pérez, J. (2016). Fármacos como contaminantes emergentes: Caracterización, cuantificación y eliminación en plantas de tratamiento de aguas residuales. [Tesis doctoral, Universidad de Oviedo].
- Pérez, L. (2019). Optimización de las operaciones de separación de biomasa algal. [Tesis doctoral, Universidad de Vigo].
- Pérez, O., Escalante, F. M., de-Bashan, L. E. & Bashan, Y. (2011). Heterotrophic cultures of microalgae: metabolism and potential products. *Water Research*, 45(1), 11-36. doi: 10.1016/j.watres.2010.08.037
- Petrovic M., González S. & Barceló D. (2003). Analysis and removal of emerging contaminants in wastewater and drinking water. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 22(10), 685–696. doi: 10.1016/S0165-9936(03)01105-1
- Phycospectrum (2009). JABU. *Journal of Algas Biomass Utilization*.

- Phytocontrol. (2020). *Opinión ANSES Diclofenaco en Aguas para Consumo Humano - Phytocontrol*. [online] [Accessed 19 Feb. 2020]. Recuperado de: <http://www.phytocontrol.com/es/vigilancia-reglementaria/opinion-anses-diclofenaco-en-aguas-para-consumo-humano/>
- Pilon-Smits, E. (2005). Phytoremediation. *Annual Review of Plant Biology*, 56, 15-39. doi: 10.1146/annurev.arplant.56.032604.144214
- Pino, M. R., Muñoz, S., Val, J. & Navarro, E. (2016). Phytotoxicity of 15 common pharmaceuticals on the germination of *Lactuca sativa* and photosynthesis of *Chlamydomonas reinhardtii*. *Environmental Science and Pollution Research*. 23(22): 22530-22541. doi: 10.1007/s11356-016-7446-y
- Poiger, T., Buser, H. R. & Müller, M. D. (2009). Photodegradation of the pharmaceutical drug diclofenac in a lake: Pathway, field measurements, and mathematical modeling. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 20(2), 256–263. doi: 10.1002/etc.5620200205
- Porra, R. J., Thompson, W. A. & Kriedemann, P. E. (1989). Determination of accurate extinction coefficients and simultaneous equations for assaying chlorophylls a and b extracted with four different solvents: verification of the concentration of Chlorophyll standards by atomic absorption spectroscopy. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)- Bioenergetics*, 975(3), 384-394. . doi: 10.1016/S0005-2728(89)80347-0
- Prieto-Rodríguez, L., Miralles-Cuevas, S., Oller, I., Agüera, A., Li-Puma, G. & Malato, S. (2012). Treatment of emerging contaminants in wastewater treatment plants (WWTP) effluents by solar photocatalysis using low TiO<sub>2</sub> concentrations. *Journal of Hazardous Materials*, 211-212, 131-137. doi: 10.1016/j.jhazmat.2011.09.008
- Pulz, O. & Scheinbenbogan, K. (1998). Photobioreactors: design and performance with respect to light energy input. *Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology*, 59, 123-152. doi: 10.1007/BFb0102298

- Quiroga, J., Quero-Pastor, M. & Acevedo, A. (2015). Tratamientos avanzados para la eliminación de fármacos en aguas superficiales. *Revista Salud Ambiental*, 15, 12-64.
- Ramos, C. (2009). Medicamentos de consumo humano en el agua, propiedades físico-químicas. *Revista Cubana de Higiene y Epidemiología*. *Obtenido de Revista Cubana de Higiene y Epidemiología*, 47(2). Recuperado de: [http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S1561-30032009000200008&lng=es&tlng=es](http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1561-30032009000200008&lng=es&tlng=es)
- Rauch-Williams, T., Hoppe-Jones, C. & Drewes, J. E. (2010). The role of organic matter in the removal of emerging trace organic chemicals during managed aquifer recharge. *Water Research*, 44(2), 449-460. doi: 10.1016/j.watres.2009.08.027
- Rawat, I., Ranjith, R., Mutanda, T. & Bux, F. (2011). Dual role of microalgae: Phycoremediation of domestic wastewater and biomass production for sustainable biofuels production. *Applied Energy*, 88(10), 3411-3424. doi: 10.1016/j.apenergy.2010.11.025
- Reboloso, M. M., Camacho, F., Navarro, A. & Guil, J. (2001). Biomass nutrient profiles of the microalga *Nannochloropsis*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 49(6), 2966-2972. doi: 10.1021/jf0010376
- Richmond, A. (Ed.), (2004). *Handbook of microalgal culture: Biotechnology and applied phycology*. Reino Unido: Ed. Blackwell Science.
- Rivera-Solís, R., Peraza, S. & Herrera, V. (2011). La microalga verde *Chlamydomonas reinhardtii*: nueva alternativa para la producción de proteínas recombinantes de interés médico. *Ciencia*. Recuperado de: [http://www.revistaciencia.amc.edu.mx/online/720\\_MICROALGA.pdf](http://www.revistaciencia.amc.edu.mx/online/720_MICROALGA.pdf)
- Rivera-Utrilla, J., Sanchez-Polo, M., Ferro-Garcia, M. A., Prados-Joya, G. & Ocampo-Perez, R., (2013). Pharmaceuticals as emerging contaminants and their removal from water. A review. *Chemosphere*, 93, 1268–1287. doi: 10.101006/j.chemosphere.2013.07.059
- Roberts, J. & Morrow, J. (2007). *Las bases farmacológicas de la terapéutica*. México: Ed. Mac Graw Hill.

- Roberts, P. H. & Thomas, K. V. (2006). The occurrence of selected pharmaceuticals in wastewater effluent and surface waters of the lower Tyne catchment. *The Science of the Total Environment*, 356(1-3), 143-153. doi: 10.1016/j.scitotenv.2005.04.031
- Robledo, V. H., Velázquez, M. A., Montañez, J. L., Pimentel, J. L., Vallejo, A. A., López, M. D. & Venegas J. (2017). Hidroquímica y contaminantes emergentes en aguas residuales urbano industriales de Morelia, Michoacán, México. *Revista Internacional de Contaminación Ambiental*, 33(2), 221-235. doi: 10.20937/RICA.2017.33.02.04
- Rodolfi, L. & Zittelli, G. (2009). Microalgae for oil: Strain selection, induction of lipid synthesis and outdoor mass cultivation in a low-cost photobioreactor. *Biotechnology and Bioengineering*, 102, 100-112. doi: 10.1002/bit.22033
- Rodríguez, R. L. (2010). Influencia de los fármacos presentes en el agua residual sobre la resistencia de la bacteria *Escherichia coli* y su eliminación por oxidación avanzada. [Tesis de doctorado, CONACyT].
- Roig, J. D. (2013). Eliminación de contaminantes emergentes mediante Humedales Artificiales como sistema alternativo o complementario a un tratamiento de aguas convencional. [Tesis de maestría, Universidad Politécnica de Valencia].
- Round, F. E. (1973). *Biología das Algas*. Rio de Janeiro: Editora Guanabara Dois S.A.
- Ruiz, A. (2011). Puesta en marcha de un cultivo de microalgas para la eliminación de nutrientes de un agua residual urbana previamente tratada anaeróbicamente. [Tesis de maestría, Universidad Politécnica de Valencia].
- Ruiz-Marin, A., Mendoza-Espinosa, L.G. & Stepherson, T. (2010). Growth and nutrient removal in free and immobilized green algae in batch and semi-continuous cultures treating real wastewater. *Bioresource Technology*, 101(1), 58-64. doi: 10.1016/j.biortech.2009.02.076
- Salt, D., Smith, R. & Raskin, I. (1998). Phytoremediation. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, 49, 643-668. doi: 10.1146/annurev.arplant.49.1.643

- Sánchez-Varo, R. (1995). Biotecnología de microalgas. [Tesis de licenciatura, Universidad de California].
- Sánchez-Torres, H., Juscamaita, J. & Vargas, J. (2008). Crecimiento mixotrófico de la microalga *Nannochloropsis oculata* en ensilado biológico de pescado. *The Biologist*, 6 (2), 94-100.
- Santos, H. L., Araujo, A. N., Fachini, A., Pena, A., Delerue-Matos, C. & Montenegro, M. C. (2010). Ecotoxicological aspects related to the presence of pharmaceuticals in the aquatic environment. *Journal of Hazardous Materials*, 175 (1-3), 45-49 doi: 10.1016/j.jhazmat.2009.10.100
- Santos, J. L., Aparicio, I. & Alonso, E. (2007). Occurrence and risk assessment of pharmaceutically active compounds in wastewater treatment plants. A case study: Seville City (Spain). *Environment International*, 33(4), 596-601. doi: 10.1016/j.envint.2006.09.014
- Sathishkumara, P., Alias Meenab, R. A., Palanisamic, T., Ashokkumard, V., Palvannane, T. & Long Gu, F. (2020). Occurrence, interactive effects and ecological risk of diclofenac in environmental compartments and biota - a review. *Science of The Total Environment*, 698, 134057. doi: 10.1016/j.scitotenv.2019.134057
- Scaife, M. A., Nguyen, G., Rico, J., Lambert, D., Helliwel, K. E. & Smith, A. G. (2015). Establishing *Chlamydomonas reinhardtii* as an industrial biotechnology host. *Plant Journal*, 82(3), 532-46. doi: 10.1111 / tpj.12781
- Schmitt-Jansen, M., Bartels, P., Adler, N. & Altenburger, R. (2007). Phytotoxicity assessment of diclofenac and its phototransformation products. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 387, 1389-1396. doi: 10.1007/s00216-006-0825-3
- Schwaiger, J., Ferling, H., Mallow, U., Wintermayr, H. & Negele, R. D. (2004). Toxic effects of the non-steroidal anti-inflammatory drug diclofenac Part I: histopathological alterations and bioaccumulation in rainbow trout. *Aquatic Toxicology*, 68(2), 141-150. doi: 10.1016/j.aquatox.2004.03.014
- Schouten, S., Moerkerken, P., Gelin, F., Baas, M., de Leeuw, J. W. & Sinninghe Damsté, J. S. (1998). Structural characterization of aliphatic, non-hydrolyzable

- biopolymers in freshwater algae and a leaf cuticle using ruthenium tetroxide degradation. *Phytochemistry*, 49(4), 987-993. doi: 10.1016/S0031-9422(97)00942-4
- Sharma, K. & Kaushik, G. (2017). NSAIDS in the environment: From emerging problem to green solution. *Annals of Pharmacology and Pharmaceutics*, 2(14), 1-3. doi: 10.1007/s10661-020-8161-1
- Shashirekha, V., Sivakumar, M. & Seshadri, S. (2016). Effective C–N–P ratio for growth and nutrient removal efficiency of *Scenedesmus obliquus* in sugar mill effluent. *Energy, Ecology and Environment*, 1(5), 283–295. doi: 10.1007/s40974-016-0040-9
- Soplín, H. (2015). Uso del fertilizante foliar 11N8P6K en el aislamiento y cultivo de *Scenedesmus* sp. (Meyen, 1829) (Chlorophyta: Scenedesmaceae) en condiciones de laboratorio. [Tesis de licenciatura, Universidad Nacional de la Amazonía Peruana].
- SRC PhysProp Database (2012). Base de datos de propiedades físicas. Recuperado de: <https://esc.syrres.com/fatepointer/search.asp>
- Stephens, E., Ross, I., Mussgnug, J., Wagner, L., Borowitzka, M., Posten, C., Kruse, O. & Hankamer, B. (2010). Future prospects of microalgal biofuels production systems. *Trends in Plant Science*, 15(10), 554-564. doi: 10.1016/j.tplants.2010.06.003
- Stewart, W. D. P. (1974). *Algal physiology and biochemistry*. Oxford: Blackwell Scientific Publications.
- Stottmeister, U., Wiebner, A., Kusch, P., Kappelmeyer, U., Kâstner, M., Bederski, O., Müller, R. & Moormann, H. (2003). Effects of plants and microorganisms in constructed wetlands for wastewater treatment. *Biotechnology Advances*, 22(1-2), 93-117. doi: 10.1016/j.biotechadv.2003.08.010
- Su, C. H., Fu, C. C., Chang, Y. C., Nair, G. R., Ye, J. L., Chu, I. M. & Wu, W. T. (2008). Simultaneous estimation of chlorophyll a and lipids contents in microalgae by three-color analysis. *Biotechnology and Bioengineering*, 99, 1034-1039. doi: 10.1002/bit.21623

- Sun, N., Wang, Y., Li, Y. T., Huang, J. C. & Chen, F. (2008). Sugar-based growth, astaxanthin accumulation and carotenogenic transcription of heterotrophic *Chlorella zofingiensis* (Chlorophyta). *Process Biochemistry*, 43(11), 1288–1292. doi: 10.1016/j.procbio.2008.07.014
- Ternes T.A., Janex-Habibi M.J., Knacker T., Kreuzinger N., & Siegrist H. (2004). *Assessment of technologies for the removal of pharmaceuticals and personal care products in sewage and drinking water facilities to improve the indirect potable water reuse*. (Contract No. EVKI-CT-2000-00047). Alemania: Federal Institute of Hydrology.
- Thies, F., Backhaus, B., Bossman, B. & Grimme, L. H. (1996). Xenobiotic biotransformation in unicellular green algae (Involvement of cytochrome P450 in the activation and selectivity of the pyridazinone pro-herbicide metflurazon. *Plant Physiology*, 112(1), 361-370. doi: 10.1104/pp.112.1.361
- Tixier, C., Singer, H. P., Oellers, S. & Müller, S.R. (2003). Occurrence and fate of carbamazepine, clofibric acid, diclofenac, ibuprofen, ketoprofen, and naproxen in surface waters. *Environmental Science and Technology*, 37(6), 1061-1068. doi: 10.1021/es025834r
- Turon, V., Baroukh, C., Trably, E., Latrille, E., Fouilland, E. & Steyer, J. P. (2015). Use of fermentative metabolites for heterotrophic microalgae growth: Yields and kinetics. *Bioresource Technology*, 175: 342–349. doi: 10.1016/j.biortech.2014.10.114
- UTEX (2021). Culture collection of algae at the University of Texas at Austin. Recuperado de: <https://utex.org/products/utex-0026?variant=30991239970906>
- Valdés, A. (2009). *Evaluación de la toxicidad producida por diclofenaco sobre Daphnia magna*. [Tesis de maestría, Instituto Politécnico Nacional].
- Van Vooren, G., Le Grand, F., Legrand, J., Cuine, S., Peltier, G. & Pruvost, J. (2012). Investigation of fatty acids accumulation in *Nannochloropsis oculata* for biodiesel application. *Bioresource Technology*, 124, 421- 432. doi: 10.1016/j.biortech.2012.08.009

- Vannini, C., Domingo, G., Marsoni, M., De Mattia, F., Labra, M., Castiglioni, S. & Bracale, M. (2011). Effects of a complex mixture of therapeutic drugs on unicellular algae *Pseudokirchneriella subcapitata*. *Aquatic Toxicology*, 101 (2), 459-465. doi: 10.1016/j.aquatox.2010.10.011
- Verlicchi, P., Al Aukidya, M. & Zambello, E. (2012). Occurrence of pharmaceutical compounds in urban wastewater: Removal, mass load and environmental risk after a secondary treatment—A review. *Science of the Total Environment*, 429, pp. 123-155. doi: 10.1016/j.scitotenv.2012.04.028
- Vienno, N. & Sillanpää, M. (2014). Fate of diclofenac in municipal wastewater treatment plant—a review. *Environment International*, 69, 28-39. doi: 10.1016/j.envint.2014.03.021
- Wang, H., Xiong, H., Hui, Z. & Zeng, X. (2012). Mixotrophic cultivation of *Chlorella pyrenoidosa* with diluted primary piggery wastewater to produce lipids, *Bioresource Technology*, 104: 215–220. doi: 10.1016/j.biortech.2011.11.020
- Wang, S. B., Chen, F., Sommerfeld, M. & Hu, Q. (2004). Proteomic analysis of molecular response to oxidative stress by the green alga *Haematococcus pluvialis* (Chlorophyceae). *Planta*, 220, 17-29. doi: 10.1007/s00425-004-1323-5
- Wang, X. X., Zhang, T. Y., Dao, G. H., Xu, Z. B., Wu, Y. H. & Hu, H. Y. (2020). Assessment and mechanisms of microalgae growth inhibition by phosphonates: Effects of intrinsic toxicity and complexation. *Water Research*, 186, 116333. doi: 10.1016/j.watres.2020.116333
- Wehr, J. D. (2007). Algae: Anatomy, biochemistry and biotechnology by Barsanti, L. & Gualtieri, P. *Journal of Phycology*, 43(2), 412-414. doi: 10.1111/j.1529-8817.2007.00335.x
- Westerhoff, P., Yoon, Y., Snyder, S. & Wert, E. (2005). Fate of endocrine-disrupter, pharmaceuticals and personal care product chemicals during simulated drinking water treatment process. *Environmental Science and Technology*, 39(17), 6649-6663. doi: 10.1021/es0484799
- Wu, G., Geng, J., Li, S., Li, J., Fu, Y., Xu, K., Ren, H. & Zhang, X. (2019) Abiotic and biotic processes of diclofenac in enriched nitrifying sludge: Kinetics,

- transformation products and reactions. *The Science of the Total Environment*, 683, 80-88. doi: 10.1016/j.scitotenv.2019.05.216
- Wu, J., Zhang, Y., Luo, X., She, Y., Yu, L., Chen, S. & Mai, B. (2012). A review of polybrominated diphenyl ethers and alternative brominated flame retardants in wildlife from China: Levels, trends, and bioaccumulation characteristics. *Journal of Environmental Sciences*, 24(2), 183-194. doi: 10.1016/s1001-0742(11)60758-4
- Xiao, R. & Zheng, Y. (2016). Overview of microalgal extracellular polymeric substances (EPS) and their applications. *Biotechnology Advances*, 34(7), 1225-1244. doi: 10.1016/j.biotechadv.2016.08.004
- Xiong, J. Q., Kurade, M. B., Abou-Shanab, R. A. I., Ji, M. K., Choi, J., Kim, J. O. & Jeon, B. H. (2016). Biodegradation of carbamazepine using freshwater microalgae *Chlamydomonas mexicana* and *Scenedesmus obliquus* and the determination of its metabolic fate. *Bioresource Technology*, 205, 183-190. doi: 10.1016/j.biortech.2016.01.038
- Xiong, J. Q., Kurade, M. B., Patil, D. V., Jang, M., Paeng, K. J. & Jeon, B. H. (2017). Biodegradation and metabolic fate of levofloxacin via a freshwater green alga, *Scenedesmus obliquus* in synthetic saline wastewater. *Algal Research*, 25, 54-61. doi: 10.1016/j.algal.2017.04.012
- Xiong, W., Gao, C., Yan, D., Wu, C. & Wu, Q. (2010). Double CO<sub>2</sub> fixation in photosynthesis-fermentation model enhances algal lipid synthesis for biodiesel production. *Bioresource Technology*, 101 (7), 2287-2293. doi: 10.1016/j.biortech.2009.11.041
- Yeh, K. & Chang, J. (2012). Effects of cultivation conditions and media composition on cell growth and lipid productivity of indigenous microalgae *Chlorella vulgaris* ESP-31. *Bioresource. Technology*, 105, 120–7. doi: 10.1016/j.biortech.2011.11.103
- Yang, H., Lee, E. & Kim, H. (1997). *Spirulina platensis* inhibits anaphylactic reaction. *Life Science*, 61, 1237-1244. doi: 10.1016/s0024-3205(97)00668-1

- Yu, J. T., Bouwer, E. J. & Coelhan, M. (2006). Occurrence and biodegradability studies of selected pharmaceuticals and personal care products in sewage effluent. *Agricultural Water Management*, 86(1-2), 72-80. doi: 10.1016/j.agwat.2006.06.015
- Zhang, D. Q., Gersberg, R. M., Hua, T., Zhu, J., Goyal, M. K., Ng, W. J., et al. (2013). Fate of pharmaceutical compounds in hydroponic mesocosms planted with *Scirpus validus*. *Environmental Pollution*, 181, 98–106. doi: 10.1016/j.envpol.2013.06.016
- Zhang, D. Q., Tan, S. K., Gersberg, R. M., Sadreddini, S., Zhu, J. & Tuan, N. A. (2011). Removal of pharmaceutical compounds in tropical constructed wetlands. *Ecological Engineering*, 37(3), 460-464. doi: 10.1016/j.ecoleng.2010.11.002
- Zhang, N., Li, J. M., Liu, G. G., Chen, X. L. & Jiang, K. (2017). Photodegradation of diclofenac in aqueous solution by simulated sunlight irradiation: kinetics, thermodynamics and pathways. *Water Science and Technology*, 75(9-10), 2163-2170. doi: 10.2166/wst.2017.075
- Zhang, N., Liu, G., Liu, H., Wang, Y., He, Z. & Wang, G. (2011). Diclofenac photodegradation under simulated sunlight: Effect of different forms of nitrogen and kinetics. *Journal of Hazardous Materials*, 192, 411-418. doi: 10.1016/j.jhazmat.2011.05.038
- Zhang, Y., Guo, J., Yao, T., Zhang, Y., Zhou, X. & Chu, H. (2019). The influence of four pharmaceuticals on *Chlorella pyrenoidosa* culture. *Scientific Reports*, 9: 1624. doi: 10.1038/s41598-018-36609-4
- Zhang, Z. & Volkman, J. K. (2017). Algaenan structure in the microalga *Nannochloropsis oculata* characterized from stepwise pyrolysis. *Organic Geochemistry*, 104, 1-7. doi: 10.1016/j.orggeochem.2016.11.005
- Zhou, G. J., Peng, F. Q., Zhang, L. J. & Ying, G. G. (2012). Biosorption of zinc and copper from aqueous solutions by two freshwater green microalgae *Chlorella pyrenoidosa* and *Scenedesmus obliquus*. *Environmental Science and Pollution Research*, 19(7), 2918-2929. doi: 10.1007/s11356-012-0800-9
- Zhou, G. J., Peng, F. Q., Zhang, L. J. & Ying, G. G. (2013). Cellular responses and

- bioremoval of nonylphenol and octylphenol in the freshwater green microalga *Scenedesmus obliquus*. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 87(1), 10-16. doi: 10.1016/j.ecoenv.2012.10.002
- Zhou, G. J., Ying, G. G., Liu, S., Zhou, L. J., Chen, Z. F. & Peng, F. Q. (2014). Simultaneous removal of inorganic and organic compounds in wastewater by freshwater green microalgae. *Environmental Science Process and Impacts*, 16(8), 2018-2027. doi: 10.1039/C4EM00094C
- Zhu, S., Liu, B., Chen, B., Zhang, J. & Liu, W. (2014). Effects of three pharmaceuticals and personal care products on growth and photosystem II in *Scenedesmus obliquus*. *Zhongshan Daxue Xuebao/Acta Scientiarum Naturalium Universitatis Sunyatseni*, 53 (1), 121-126.
- Zorita, S., Martensson, L. & Mathiasson, L. (2009). Occurrence and removal of pharmaceuticals in a municipal sewage treatment system in the south of Sweden. *Science of the Total Environment*, 40(8), 2760-2770. doi: 10.1016/j.scitotenv.2008.12.030
- Zwiener, C. & Frimmel, F. (2000). Oxidative treatment of pharmaceuticals in water. *Water Research*, 34(6), 1881-1897.

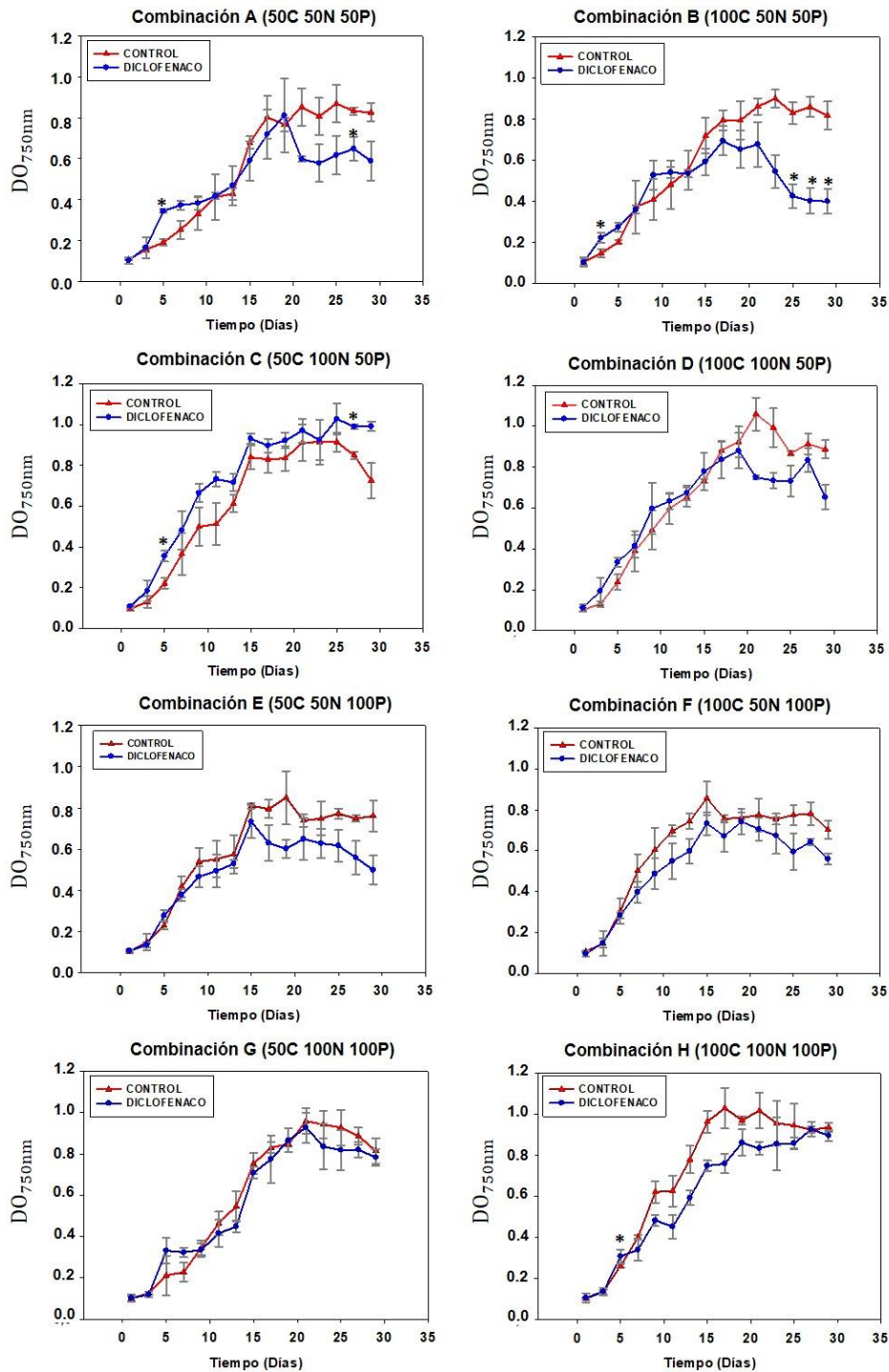
## APÉNDICE A

### A.1. EFECTO DE LA COMPOSICIÓN DEL MEDIO DE CULTIVO SOBRE EL CRECIMIENTO DE LAS MICROALGAS POR MEDIO DE LA DENSIDAD ÓPTICA

Se realizaron las cinéticas de crecimiento de cada microalga de manera independiente, variando las concentraciones de carbono, nitrógeno y fósforo (50 y 100% de la concentración original), en ausencia (Control) y presencia de diclofenaco (Tabla 9), para conocer el comportamiento de las microalgas con las modificaciones de los nutrientes y la adición del fármaco.

Se agregaron 70 mL de medio (TAP o Bold, según la microalga) en 8 matraces Erlenmeyer de 100 mL (para las diferentes concentraciones de C, N, P; 50 y 100%), añadiendo 7 mL de preinóculo, el cual se ajustó a una  $OD_{750nm}$  inicial de 0.25 y se adiciona el volumen necesario para las concentraciones establecidas de diclofenaco. Se mantuvieron en agitación continua sin aireación con fotoperiodo de 16 h luz y 8 h oscuridad, hasta llegar a su fase estacionaria. Se tomó una alícuota de 400  $\mu$ L de los cultivos cada 48 h. y se obtuvo su absorbancia ( $OD_{750nm}$ ) en un espectrofotómetro. Los datos obtenidos son el promedio de tres réplicas biológicas.

En la Figura A1 se muestran las gráficas de cinética de crecimiento de las 8 combinaciones de nutrientes (C, N, P; 50 y 100%) en ausencia y presencia de diclofenaco ( $10 \mu\text{g mL}^{-1}$ ) de *C. vulgaris*.



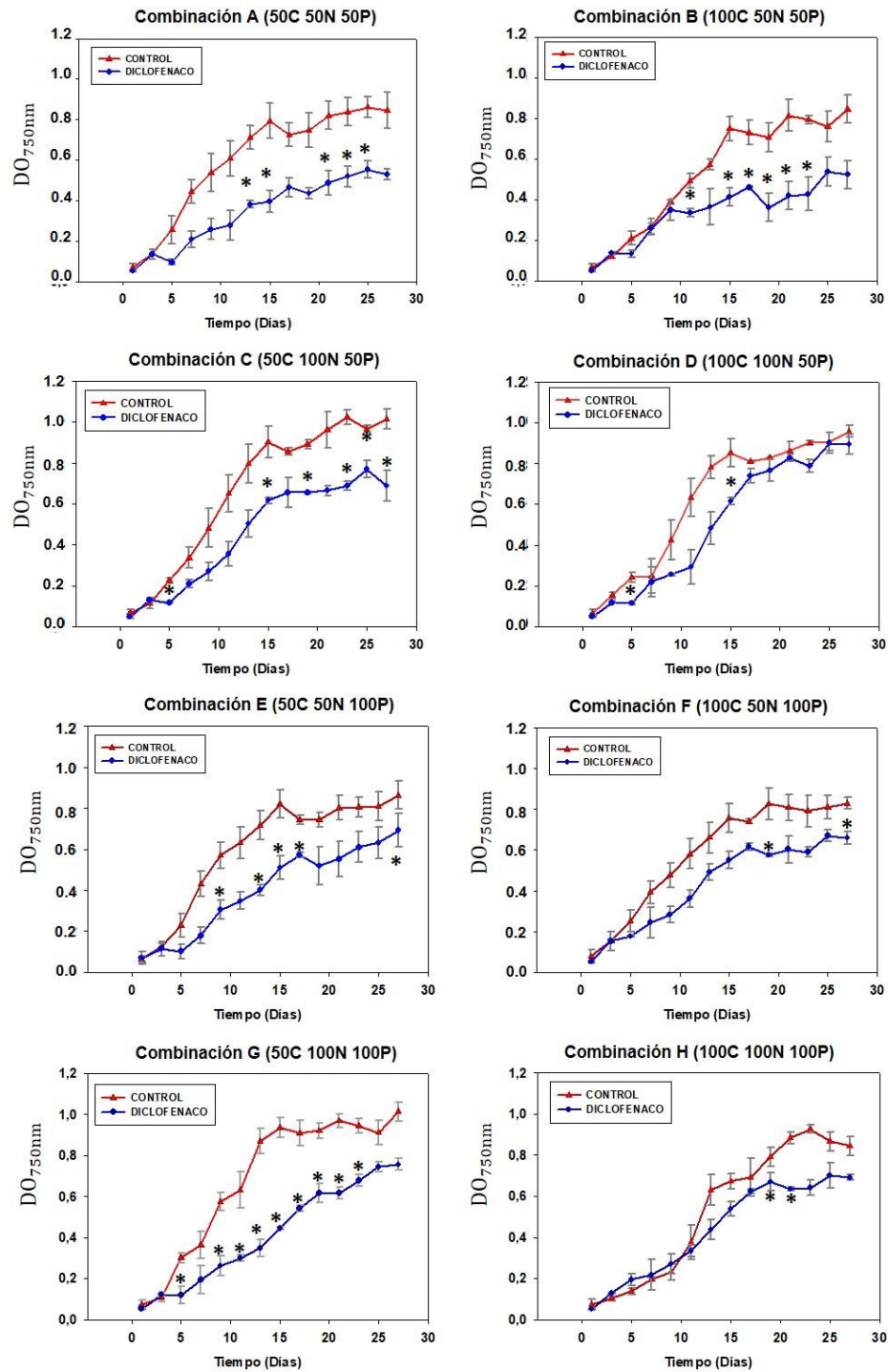
**Figura A 1. Cinética de crecimiento de *C. vulgaris*.** En presencia de diferentes concentraciones iniciales de nutrientes (C, N, P) en ausencia y presencia de diclofenaco (10  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ). Diferencias significativas ( $p < 0.05$ ) en el crecimiento respecto al control se marcan con un asterisco (\*). Prueba de Fisher.

La cinética se terminó el día 29 donde todos los cultivos habían alcanzado su fase estacionaria. Se observó que en la combinación B (100C, 50N, 50P) el cultivo con diclofenaco muestra un crecimiento significativamente menor los últimos días de la cinética, mientras que las demás combinaciones presentaron un comportamiento similar al control, esto puede deberse a la relación de déficit de nutrientes y la adición del fármaco.

El efecto del diclofenaco ha sido reportado para diferentes especies del género *Chlorella*, donde en concentraciones de 60 a 150  $\mu\text{g mL}^{-1}$  disminuye el crecimiento de *Chlorella pyrenoidosa* y en concentraciones de 100 a 350  $\mu\text{g L}^{-1}$  no se observa inhibición en el crecimiento de *Chlorella sorokiniana* (de Wilt *et al.*, 2016; Zhang *et al.*, 2019), mientras que Escapa *et al.* (2017) reportó que a concentraciones de 25  $\mu\text{g mL}^{-1}$  de diclofenaco provocaba un 45% más crecimiento en *C. sorokiniana* y un 35% más crecimiento en *C. vulgaris* respecto a su control. Estas diferencias pueden ser ocasionadas por la diferencia en la especie de microalga (Hernández-Pérez y Labbé, 2014).

Sin embargo, concuerdan con nuestros resultados, donde no se observa disminución significativa en el crecimiento por la adición del diclofenaco.

En la Figura A2 se muestran las gráficas de cinética de crecimiento de las 8 combinaciones de nutrientes (C, N, P; 50 y 100%) en ausencia y presencia de diclofenaco ( $10 \mu\text{g mL}^{-1}$ ) de *N. oculata*.



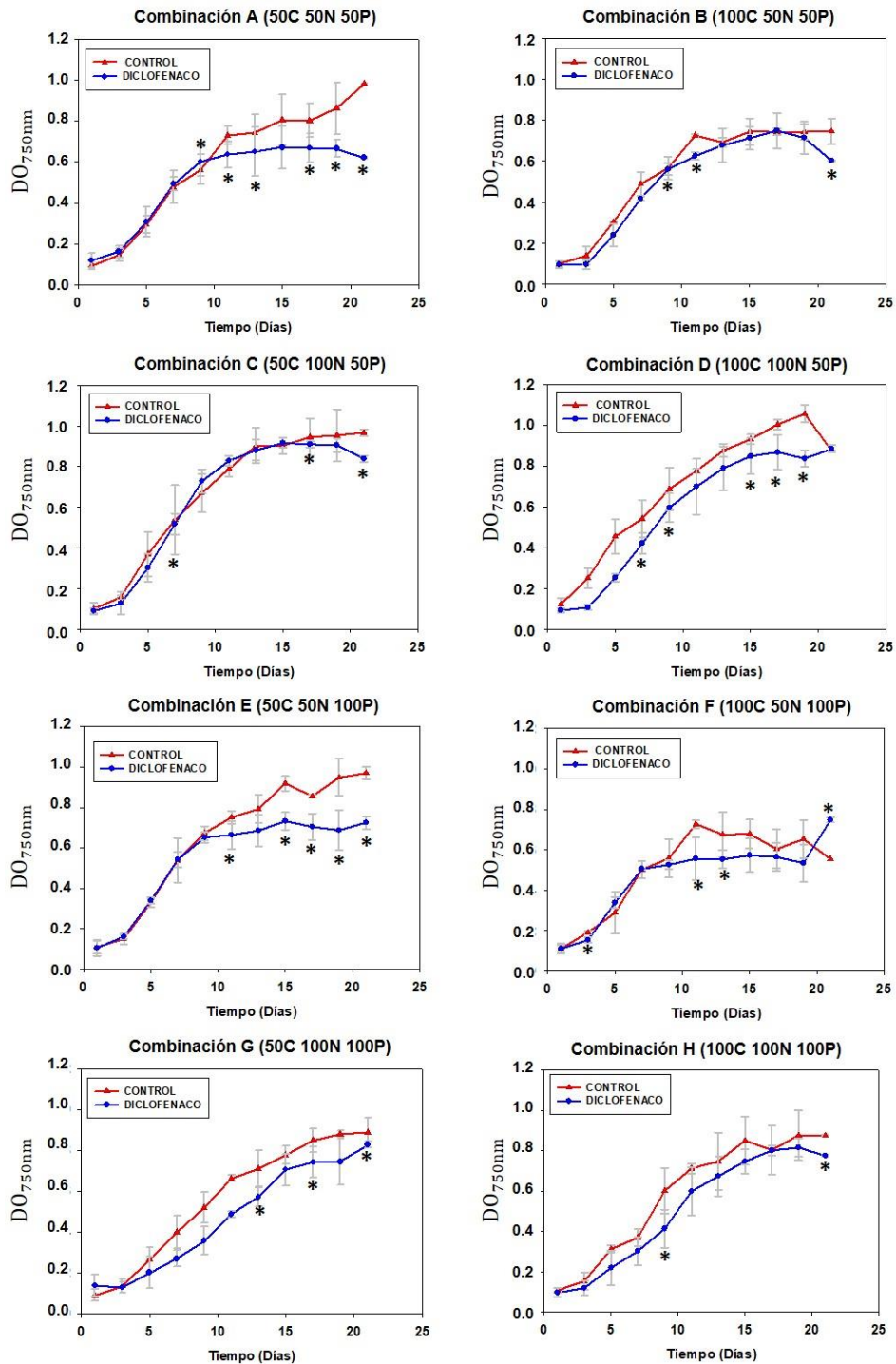
**Figura A 2. Cinética de crecimiento de *N. oculata*.** En presencia de diferentes concentraciones iniciales de nutrientes (C, N, P) en ausencia y presencia de diclofenaco (10  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ). Diferencias significativas ( $p < 0.05$ ) en el crecimiento respecto al control se marcan con un asterisco (\*). Prueba de Fisher

La cinética se terminó el día 27 donde todos los cultivos habían alcanzado su fase estacionaria. Se observó que en las 8 combinaciones el cultivo con diclofenaco muestra un crecimiento menor con respecto a su control, a lo largo de la cinética, siendo significativamente menor en las combinaciones A (50C, 50N, 50P), B (100C, 50N, 50P), C (50C, 100N, 50P), E (50C, 50N, 100P) y G (50C, 100N, 100P).

El efecto del diclofenaco pareciera contrastar con los resultados obtenidos en este mismo trabajo, donde se evaluaron diferentes concentraciones del fármaco (Figura 17a), donde no se observó un efecto negativo en el crecimiento de *N. oculata*, excepto a la concentración de  $30 \mu\text{g mL}^{-1}$ . Sin embargo la concentración usada en este experimento es  $10 \mu\text{g mL}^{-1}$  y al no observar diferencia significativa en el crecimiento de la combinación H (100C 100N 100P), la cual es la combinación control, se puede inferir que la causa de la disminución en el crecimiento es debido a la relación de déficit de nutrientes y la adición del diclofenaco.

Desafortunadamente, en la literatura no se encuentra reportado ningún trabajo donde hayan analizados los efectos del diclofenaco para especies de este género, *Nannochloropsis*, solo se encuentra reportado para otros fármacos. Por ejemplo, Grzesiuk *et al.* (2016) demostraron que la microalga *Nannochloropsis limnetica* muestra una alta sensibilidad al ibuprofeno en concentraciones mayores a  $100 \mu\text{g mL}^{-1}$ , sin embargo, al ser diferentes compuestos no se puede realizar una comparación.

En la Figura A3 se muestran las gráficas de cinética de crecimiento de las 8 combinaciones de nutrientes (C, N, P; 50 y 100%) en ausencia y presencia de diclofenaco ( $8.7 \mu\text{g mL}^{-1}$ ) de *S. acutus*.



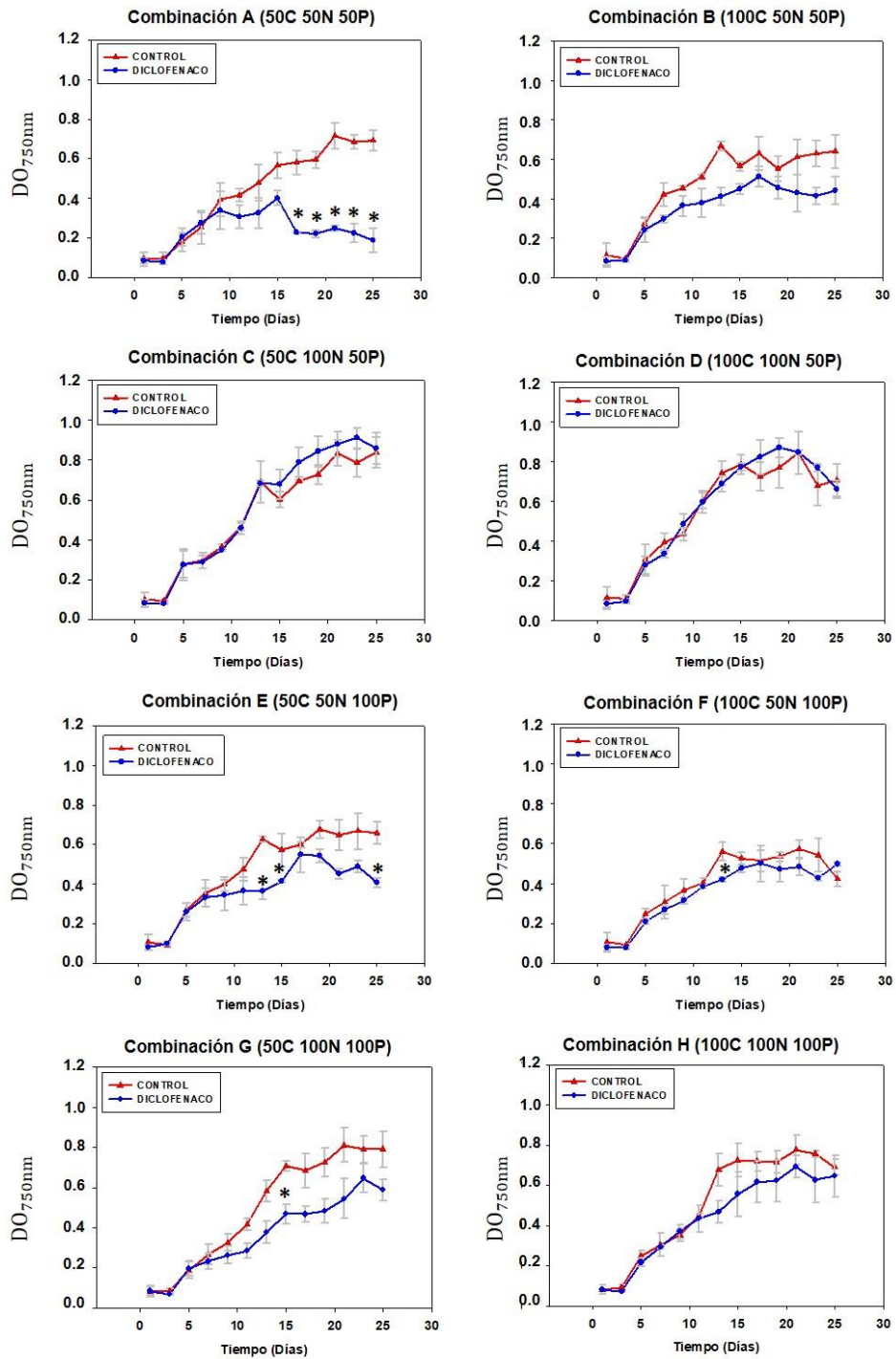
**Figura A 3. Cinética de crecimiento de *S. acutus*.** En presencia de diferentes concentraciones iniciales de nutrientes (C, N, P) en ausencia y presencia de diclofenaco (8.7  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ). Diferencias significativas ( $p < 0.05$ ) en el crecimiento respecto al control se marcan con un asterisco (\*). Prueba de Fisher.

La cinética se terminó el día 21 donde todos los cultivos habían alcanzado su fase estacionaria. Se observa una tendencia similar en el crecimiento del cultivo con diclofenaco y el cultivo control de las 8 combinaciones, sin embargo en las combinaciones A (50C, 50N, 50P), D (100C, 100N, 50P) y E (50C, 50N, 100P), el cultivo con diclofenaco presenta un crecimiento significativamente menor con respecto a su control.

En algunos estudios, se ha evaluado el efecto del diclofenaco en el crecimiento de otras especies de *Scenedesmus*, como por ejemplo, Schmitt-Jansen *et al.* (2007), que demostraron que el diclofenaco no inhibía el crecimiento de *Scenedesmus vacuolatus* a una concentración de  $50 \mu\text{g mL}^{-1}$ . También, Santos *et al.* (2010) observó una inhibición en el crecimiento de *Scenedesmus subspicatus* a una concentración de  $71.9 \mu\text{g mL}^{-1}$  de este fármaco.

Sin embargo, en estos trabajos, no evaluaron el efecto del diclofenaco en las microalgas con estrés de nutrientes, por lo que se observa una diferencia entre lo que reportaron ellos y lo obtenido en este trabajo.

En la Figura A4 se muestran las gráficas de cinética de crecimiento de las 8 combinaciones de nutrientes (C, N, P; 50 y 100%) en ausencia y presencia de diclofenaco ( $8.7 \mu\text{g mL}^{-1}$ ) de *S. obliquus*.

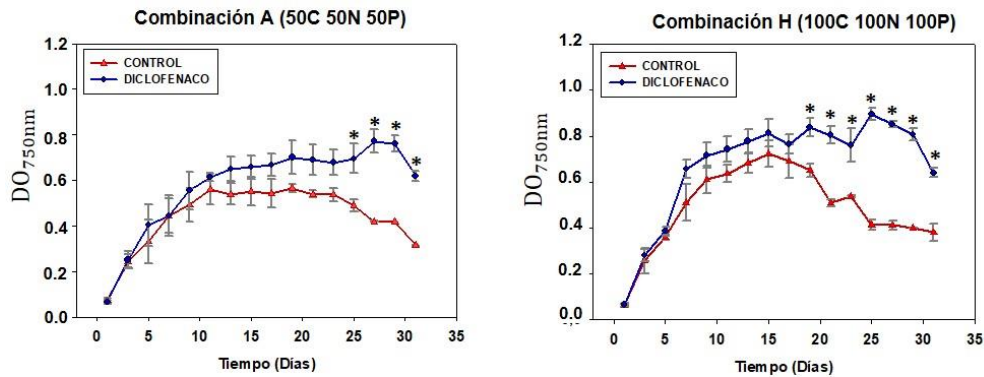


**Figura A 4. Cinética de crecimiento de *S. obliquus*.** En presencia de diferentes concentraciones iniciales de nutrientes (C, N, P) en ausencia y presencia de diclofenaco (8.7  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ). Diferencias significativas ( $p < 0.05$ ) en el crecimiento respecto al control se marcan con un asterisco (\*). Prueba de Fisher.

La cinética se terminó el día 25 donde todos los cultivos habían alcanzado su fase estacionaria. Se observó un crecimiento similar entre los cultivos, con y sin diclofenaco, excepto en la combinación A (50C, 50N, 50P), donde el cultivo con diclofenaco presentó un crecimiento significativamente menor con respecto a su control a partir del día 17, el cual pudo ser ocasionado por el déficit de nutrientes, ya que al presentar esta condición la microalga tiene que sintetizar las moléculas necesarias para crecer, sin embargo además del déficit de nutrientes, se presenta la adición del diclofenaco, lo que no permite el crecimiento óptimo para esta microalga. Fan *et al.* (2008) reportaron que un cambio en las condiciones de cultivo microalgal acarreará cambios en las fases de adaptación, de crecimiento y estacionaria.

En cuanto al crecimiento, los resultados obtenidos en este trabajo contrastan con lo reportado en la literatura donde indican que a concentraciones de 5 a 10  $\mu\text{g mL}^{-1}$  de diclofenaco, se presenta una inhibición en el crecimiento (Zhu *et al.*, 2014). Por el contrario, Escapa *et al.* (2017) evaluaron el efecto del diclofenaco a una concentración de 25  $\mu\text{g mL}^{-1}$  en el crecimiento de *S. obliquus*, observando un incremento del 11% con respecto a su control. Aun siendo la misma especie, puede haber factores que ocasionen estas diferencias, como las condiciones de cultivo, el medio de cultivo, etc.

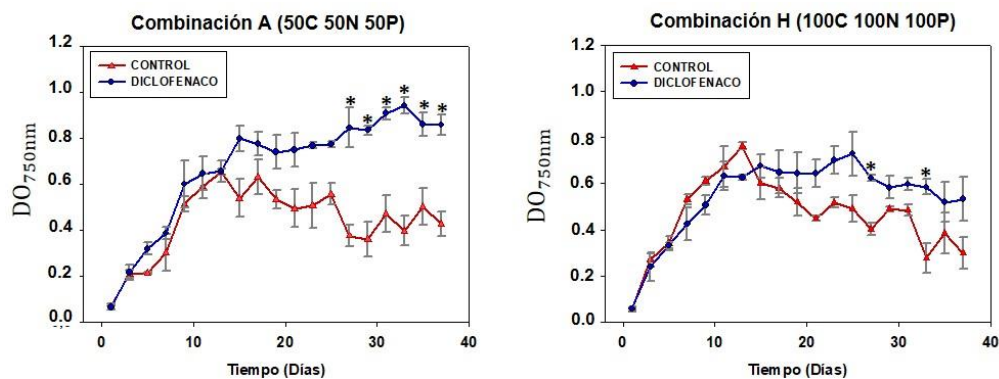
En la Figura A5 se muestran las gráficas de cinética de crecimiento de las 8 combinaciones de nutrientes (C, N, P; 50 y 100%) en ausencia y presencia de diclofenaco (5  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ) de *C. reinhardtii* CC137.



**Figura A 5. Cinética de crecimiento de *C. reinhardtii* CC137.** En presencia de diferentes concentraciones iniciales de nutrientes (C, N, P) en ausencia y presencia de diclofenaco ( $5 \mu\text{g mL}^{-1}$ ). Diferencias significativas ( $p < 0.05$ ) en el crecimiento respecto al control se marcan con un asterisco (\*). Prueba de Fisher.

La cinética se terminó el día 31 donde todos los cultivos habían alcanzado su fase estacionaria. Se observó en ambas combinaciones un crecimiento significativamente mayor en el cultivo con diclofenaco. También se puede observar que en la combinación H (100C 100N 100P) se presenta un mayor crecimiento en ambos cultivos, con respecto a los cultivos de la combinación A (50C 50N 50P). Esto pudiera deberse a los nutrientes, en donde la combinación H presenta el 100% de todos sus nutrientes y la combinación A solo el 50%. Sin embargo, al comparar con las gráficas de crecimiento por cuantificación de *clorofila a* se observa un comportamiento diferente, en donde la combinación H presenta un menor crecimiento en el cultivo con diclofenaco en comparación con la combinación A. Esto ha sido reportado por Bolier y Donze (1989) en estudios con microalgas donde se utiliza la densidad óptica como medida de crecimiento, los valores de  $\text{DO}_{750}$  pueden continuar incrementando a pesar de que el contenido de *clorofila a* disminuye. Ya que la medición por densidad óptica se considera una medición indirecta, en donde puede verse afectada por algún tipo de contaminación o células de microalgas muertas, mientras que el contenido de *clorofila a* es una determinación directa de la cantidad de biomasa.

En la Figura A6 se muestran las gráficas de cinética de crecimiento de las 8 combinaciones de nutrientes (C, N, P; 50 y 100%) en ausencia y presencia de diclofenaco ( $5 \mu\text{g mL}^{-1}$ ) de *C. reinhardtii* CC1731.



**Figura A 6. Cinética de crecimiento de *C. reinhardtii* CC1731.** En presencia de diferentes concentraciones iniciales de nutrientes (C, N, P) en ausencia y presencia de diclofenaco ( $5 \mu\text{g mL}^{-1}$ ). Diferencias significativas ( $p < 0.05$ ) en el crecimiento respecto al control se marcan con un asterisco (\*). Prueba de Fisher.

La cinética se terminó el día 37 donde todos los cultivos habían alcanzado su fase estacionaria. Se observó en ambas combinaciones un crecimiento mayor en el cultivo con diclofenaco. El cultivo con diclofenaco prolongó su fase exponencial a comparación del cultivo control. Sin embargo, sucedió lo mismo que en *C. reinhardtii* CC137, donde al comparar con sus respectivas graficas de crecimiento por cuantificación de *clorofila a*, muestran un comportamiento contrario, donde en la combinación H el desarrollo del cultivo con diclofenaco presenta un menor crecimiento que su control. Al presentar exceso de carbono, en este caso el proporcionado por el medio de cultivo y el diclofenaco, provocan una saturación de oxígeno, disminuyendo su crecimiento, porque la microalga centra sus procesos en la fotorrespiración (Xiong *et al.*, 2010).

No se observó ningún efecto negativo en el crecimiento al adicionar diclofenaco ( $5 \mu\text{g mL}^{-1}$ ) para *C. reinhardtii* CC137 y CC1731. Según los resultados obtenidos por Martínez (2018), concluyeron que el diclofenaco a concentraciones de 50, 100, 125 y

150  $\mu\text{g mL}^{-1}$  no ejercen un efecto negativo significativo sobre el crecimiento de *C. reinhardtii* tras 96 h de exposición. Sin embargo los resultados obtenidos por Majewska *et al.* (2018) mostraron un descenso significativo (más del 50%) de la densidad celular en cultivos de *C. reinhardtii* expuestos a diclofenaco a concentraciones de 134  $\mu\text{g mL}^{-1}$ . Pino *et al.* (2016) reportaron un valor de  $\text{EC}_{50}$  de  $1776 \pm 312 \mu\text{g mL}^{-1}$  para *C. reinhardtii* expuesta a diclofenaco. Estos estudios fueron realizados a concentraciones mucho más altas que la utilizada en el presente trabajo, por lo que respalda lo observado en el crecimiento de *C. reinhardtii* CC1731 y CC137.

No se observó diferencia entre el comportamiento de *C. reinhardtii* CC137 y CC1731, a pesar de que la primera tiene pared celular y la segunda carece de ésta, por lo que podemos inferir que los compuestos en la pared celular como en la membrana, interactúan de forma similar con el diclofenaco.

## GLOSARIO

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

**Intracelular:** dentro de la célula.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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