

UNIVERSIDAD NACIONAL DE CAJAMARCA

ESCUELA DE POSGRADO



UNIDAD DE POSGRADO DE LA FACULTAD DE CIENCIAS AGRARIAS

PROGRAMA DE MAESTRIA EN CIENCIAS

TESIS:

**EFFECTO DE LA DENSIDAD POBLACIONAL DE *Chlorella sp* EN LA
REMOCIÓN DE ACETAMINOFÉN DEL EFLUENTE DE LA PLANTA
DE TRATAMIENTO DE AGUAS RESIDUALES DE CELENDÍN,
CAJAMARCA, 2021.**

Para optar el Grado Académico de

MAESTRO EN CIENCIAS

MENCIÓN: GESTIÓN AMBIENTAL

Presentada por:

Bachiller: EISNER WILL CASTILLO ROJAS

Asesor:

Dr. EDIN EDGARDO ALVA PLASENCIA

Cajamarca, Perú

2023

COPYRIGHT © 2023 by
EISNER WILL CASTILLO ROJAS
Todos los derechos reservados

UNIVERSIDAD NACIONAL DE CAJAMARCA

ESCUELA DE POSGRADO



UNIDAD DE POSGRADO DE LA FACULTAD DE CIENCIAS AGRARIAS

PROGRAMA DE MAESTRIA EN CIENCIAS

TESIS APROBADA:

**EFECTO DE LA DENSIDAD POBLACIONAL DE *Chlorella sp* EN LA
REMOCIÓN DE ACETAMINOFÉN DEL EFLUENTE DE LA PLANTA
DE TRATAMIENTO DE AGUAS RESIDUALES DE CELENDÍN,
CAJAMARCA, 2021.**

Para optar el Grado Académico de

MAESTRO EN CIENCIAS

MENCIÓN: GESTIÓN AMBIENTAL

Presentada por:

Bachiller: EISNER WILL CASTILLO ROJAS

JURADO EVALUADOR

Dr. Edin Edgardo Alva Plasencia
Asesor

Dra. Consuelo Belania Plasencia Alvarado
Jurado evaluador

Dr. Alejandro Claudio Lagos Manrique
Jurado evaluador

M.Cs. Jimmy Frank Oblitas Cruz
Jurado evaluador

Cajamarca, Perú

2023



Universidad Nacional de Cajamarca
LICENCIADA CON RESOLUCIÓN DE CONSEJO DIRECTIVO N° 080-2018-SUNEDU/CD

Escuela de Posgrado
CAJAMARCA - PERU



PROGRAMA DE MAESTRÍA EN CIENCIAS

ACTA DE SUSTENTACIÓN DE TESIS

Siendo las 10.00 horas, del día 09 de marzo de dos mil veintitrés, reunidos en el Auditorio de la Escuela de Posgrado de la Universidad Nacional de Cajamarca, el Jurado Evaluador presidido por la **Dra. CONSUELO BELANIA PLASENCIA ALVARADO**, **Dr. ALEJANDRO CLAUDIO LAGOS MANRIQUE M.Cs. JIMY FRANK OBLITAS CRUZ** y en calidad de Asesor el **Dr. EDIN EDGARDO ALVA PLASENCIA**. Actuando de conformidad con el Reglamento Interno y el Reglamento de Tesis de Maestría de la Escuela de Posgrado de la Universidad Nacional de Cajamarca, se dio inicio a la Sustentación de la Tesis titulada: **EFFECTO DE LA DENSIDAD POBLACIONAL DE *Chlorella sp* EN LA REMOCIÓN DE ACETAMINOFÉN DEL EFLUENTE DE LA PLANTA DE TRATAMIENTO DE AGUAS RESIDUALES DE CELENDÍN, CAJAMARCA, 2021**. Presentada por el **Bachiller en Ciencias Ambientales, EISNER WILL CASTILLO ROJAS**.

Realizada la exposición de la Tesis y absueltas las preguntas formuladas por el Jurado Evaluador, y luego de la deliberación, se acordó APROBADA con la calificación de DI. C. A. S. R. I. S. C. I. B. la mencionada Tesis; en tal virtud, el **Bachiller en Ciencias Ambientales EISNER WILL CASTILLO ROJAS**, está apto para recibir en ceremonia especial el Diploma que lo acredita como **MAESTRO EN CIENCIAS**, de la Unidad de Posgrado de la Facultad de Ciencias Agrarias, con Mención en Gestión Ambiental.

Siendo las 12.00 horas del mismo día, se dio por concluido el acto.

.....
Dr. Edin Edgardo Alva Plasencia
Asesor

.....
Dr. Consuelo Belania Plasencia Alvarado
Jurado Evaluador

.....
Dr. Alejandro Claudio Lagos Manrique
Jurado Evaluador

.....
M.Cs. Jimy Frank Oblitas Cruz
Jurado Evaluador

DEDICATORIA

A:

Dios por las bendiciones de cada día.

Mi padre Jorge Castillo, mi madre Lidia Rojas, mi hermano José Castillo, y a toda mi familia por su apoyo económico y moral durante mis estudios y la realización de la investigación.

El autor.

AGRADECIMIENTO

A la Universidad Nacional de Cajamarca, la casa superior de estudios que me albergó durante mis estudios de pregrado y pos grado.

A mi asesor Dr. Ing. Edin Alva Plasencia, por su paciencia y colaboración en el desarrollo de la investigación.

A mi asesor Dr. Ing. Berardo Escalante Zumaeta por encaminar la investigación y su desarrollo de la misma.

A la Universidad Nacional Autónoma de Chota, por el uso de su laboratorio.

Al Dr. León Villegas Vílchez de la Universidad Peruana Cayetano Heredia por el soporte en el análisis cuantitativo y sus aportes a la investigación.

Al M. Sc. Blgo. Gustavo Olivos Ramírez de la Universidad Nacional del Santa por proveer del cultivo de *Chorella sp.* y sus orientaciones para el escalamiento del cultivo.

Al equipo técnico del Laboratorio Regional del Agua del GORECAJ, por su contribución en la investigación.

Al Ing. Shonel Cáceres y la Ing. Maryuri Vega, por permitirnos el uso del laboratorio de la Universidad Privada del norte

A mi tío Luis Alberto Castillo, por el transporte de las muestras e ingreso a laboratorio de bioquímica de la UPCH.

A la M. Sc. Ing. Azucena Chávez Collantes, compañera de investigación y soporte durante el desarrollo de la investigación.

A los miembros del jurado, por su valiosa contribución en la mejora de esta investigación.

A mis amigos, familiares y a quienes he ido conociendo en las diversas etapas de ejecución de la presente investigación, por su colaboración de todos ellos.

El autor.

*“El nuevo paradigma de este siglo es pasar
del agua residual al agua reutilizable”*

Fernando del Amo

ÍNDICE GENERAL

	Pág.
DEDICATORIA	v
AGRADECIMIENTO	vi
ÍNDICE GENERAL	viii
RESUMEN	xiv
ABSTRACT	xv
CAPÍTULO I	1
INTRODUCCIÓN.....	1
CAPÍTULO II	4
MARCO TEÓRICO	4
2.1. Antecedentes de la investigación	4
2.2. Bases teóricas.....	7
2.2.1. Microalgas	7
2.2.2. <i>Chlorella sp</i>	8
2.2.3. Cinética de crecimiento de <i>Chlorella sp</i>	9
2.2.4. Contaminantes emergentes	10
2.2.5. Paracetamol (N-(4-hidroxifenil) acetamida).....	11
2.2.6. Los fármacos como contaminantes emergentes.....	13
2.2.7. Efectos y riesgos por la presencia de fármacos en el ambiente	13
2.2.8. Aguas residuales	14
2.2.9. Tratamiento de aguas residuales	14
2.2.10. Mecanismos de biorremediación	15
2.2.11. Tratamiento de aguas residuales con microalgas.....	15
-CAPÍTULO III	20
MATERIALES Y MÉTODOS	20
3.1. Ubicación geográfica.....	20
3.2. Materiales	21
3.3. Metodología	22
CAPÍTULO IV	45
RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	45
4.1. Determinación de la concentración de acetaminofén en el efluente de la planta de tratamiento de aguas residuales de Celendín.....	45
4.2. Estimación de parámetros fisicoquímicos en los fotobiorreactores de tratamiento.....	46

4.3. Remoción del acetaminofén en el sistema de fotobiorreactores de tratamiento.....	48
4.4. Efecto de la densidad poblacional de <i>Chlorella sp</i> en la remoción de acetaminofén.....	50
CAPÍTULO V	56
CONCLUSIONES	56
RECOMENDACIONES.....	57
CAPÍTULO VI.....	58
LISTA DE REFERENCIAS	58
CAPÍTULO VII	65
APÉNDICE.....	65
ANEXOS	69

ÍNDICE DE TABLAS

	Pág.
Tabla 1 <i>Clasificación taxonómica y características de <i>Chlorella vulgaris</i>.</i>	9
Tabla 2 <i>Contaminantes emergentes, subgrupos y compuestos de interés</i>	11
Tabla 3 <i>Características físicas y químicas del paracetamol (acetaminofén)</i>	12
Tabla 4 <i>Diluciones del estándar de acetaminofén a partir de la solución madre y el promedio de las áreas de picos obtenidos.</i>	35
Tabla 5 <i>Evaluación de la estabilidad de acetaminofén a 4 ug mL⁻¹</i>	37
Tabla 6 <i>Precisión del sistema cromatográfico en tiempo de retención y áreas de las señales cromatográficas del estándar de paracetamol a la concentración de 4,08 ug mL⁻¹</i>	38
Tabla 7 <i>Datos para calcular los límites de detección y de cuantificación de acetaminofén.</i>	40
Tabla 8 <i>Límites de cuantificación y detección del acetaminofén.</i>	40
Tabla 9 <i>Datos usados para calcular el porcentaje de recuperación de acetaminofén en agua residual enriquecida, n=2, tres inyecciones</i>	41
Tabla 10 <i>Recuperación de acetaminofén en agua residual enriquecida, n=2, tres inyecciones.</i>	42
Tabla 11 <i>Frecuencia de los parámetros monitoreados</i>	42
Tabla 12 <i>Técnicas e instrumentos de recopilación de información</i>	44
Tabla 13 <i>Concentraciones de acetaminofén en el efluente de la planta de tratamiento de aguas residuales.</i>	45
Tabla 14 <i>Valores promedio de monitoreo de parámetros de campo</i>	46
Tabla 15 <i>Concentraciones de acetaminofén en muestras de agua residual post tratamiento con <i>Chorella sp.</i></i>	49
Tabla 16 <i>Corrección con desviación estándar inicial y corrección con desviación estándar a 5 días.</i>	50
Tabla 17 <i>Remoción de acetaminofén en muestras de agua residual tratadas con <i>Chorella sp.</i> (100 mL, 200 mL y 300 mL).</i>	51
Tabla 18 <i>Valores promedio de monitoreo de parámetros de campo</i>	69
Tabla 19 <i>Prueba de normalidad de eficiencia de remoción de acetaminofén</i>	76
Tabla 20 <i>Prueba de homogeneidad de la densidad poblacional de <i>Chlorella sp</i> de F de Levene</i>	77
Tabla 21 <i>Análisis de varianza – ANOVA</i>	77
Tabla 22 <i>Prueba de Tukey</i>	78
Tabla 23 <i>Prueba de variación de medias</i>	78
Tabla 24 <i>Prueba de homogeneidad de la densidad poblacional de <i>Chlorella sp</i> de F de Levene</i>	79

ÍNDICE DE FIGURAS

	Pág.
Figura 1 Crecimiento celular en discontinuo	10
Figura 2 Procesos de tratamiento de aguas residuales.....	15
Figura 3 Proceso de adsorción de contaminantes	18
Figura 4 Proceso de absorción de contaminantes	19
Figura 5 Ubicación del proyecto en la ciudad de Cajamarca.....	20
Figura 6 Diseño del sistema de fotobioreactores.....	24
Figura 7 Cámara de Neubauer - conteo en cuadrantes extremos.....	28
Figura 8 Curva de calibración para el estándar de acetaminofén.	36
Figura 9 Concentraciones de los promedios de residuos de acetaminofén en muestras de agua residual tratadas con microalga <i>Chorella sp.</i> inicial y luego de 5 días.	51
Figura 10 Remoción de acetaminofén a diferentes densidades poblacionales de <i>Chorella sp.</i> (100 mL, 200 mL y 300 mL).	52
Figura 11 Recolección de agua residual de la planta de tratamiento de Celendín.	65
Figura 12 Cultivo, escalamiento, mantenimiento y aclimatación de <i>Chlorella sp</i>	65
Figura 13 Identificación, control y recuento en cámara Neubauer (Microscopio electrónico) .	66
Figura 14 Pesaje de acetaminofén	66
Figura 15 Instalación del experimento.....	66
Figura 16 Monitoreo de parámetros de campo	67
Figura 17 Muestro y envío a laboratorio	67
Figura 18 Preparación y procesamiento de muestras en laboratorio de bioquímica UPCH	68
Figura 19 Corrida de muestras, análisis cuantitativo por HPLC – Laboratorio de bioquímica UPCH.....	68
Figura 20 Cromatograma del estándar de acetaminofén.....	70
Figura 21 Cromatograma del blanco, agua residual sin enriquecer con soluciones de estándar de acetaminofén.....	70
Figura 22 Cromatograma de la muestra de agua residual enriquecidas con acetaminofén 4.1 ug mL ⁻¹	71
Figura 23 Cromatograma de la muestra T _{100R1} : Agua residual + 100 mL de <i>Chorella sp</i> + 4 mg acetaminofén.....	71
Figura 24 Cromatograma de la muestra T _{100R2} : Agua residual + 100 mL de <i>Chorella sp</i> + 4 mg acetaminofén.....	72
Figura 25 Cromatograma de la muestra T _{100R3} : Agua residual + 100 mL de <i>Chorella sp</i> + 4 mg acetaminofén/Litro.....	72
Figura 26 Cromatograma de la muestra T _{200R1} : Agua residual + 200 mL de <i>Chorella sp</i> + 4 mg acetaminofén.....	73
Figura 27 Cromatograma de la muestra T _{200R2} : Agua residual + 200 mL de <i>Chorella sp</i> + 4 mg acetaminofén.....	73
Figura 28 Cromatograma de la muestra T _{200R3} : Agua residual + 200 mL de <i>Chorella sp</i> + 4 mg acetaminofén/Litro.....	74
Figura 29 Cromatograma de la muestra T _{300R1} : Agua residual + 300 mL de <i>Chorella sp</i> + 4 mg acetaminofén.....	74
Figura 30 Cromatograma de la muestra T _{300R2} : Agua residual + 300 mL de <i>Chorella sp</i> + 4 mg acetaminofén.....	75

Figura 31 Cromatograma de la muestra T_{300R3} : Agua residual + 300 mL de *Chorella* sp + 4 mg acetaminofén..... 75

LISTA DE ABREVIATURAS

Ac	: Acetaminofén
AINE	: Fármacos antiinflamatorios no esteroides
ARD	: Agua residual doméstica
ASHP	: Sociedad estadounidense de farmacéuticos del sistema de salud
CE	: Contaminantes emergentes
CENTA	: Centro de las nuevas tecnologías del agua de Sevilla
EPA	: Agencia para la Protección Ambiental
HPLC	: Cromatografía líquida de alta resolución
MINAM	: Ministerio del ambiente
MINSA	: Ministerio de salud
MVCS	: Ministerio de vivienda construcción y saneamiento
OEFA	: Organismo de evaluación y fiscalización ambiental
OMS	: Organización Mundial de la Salud
PTAR	: Planta de tratamiento de aguas residuales
s.f.	: Sin fecha
C- C+ T2 T3 T4	: Controles y tratamientos
T _{100R1} , T _{100R2} y T _{100R3}	: Tratamiento con 100 mL de biomasa fresca de <i>Chlorella sp</i>
T _{200R1} , T _{200R2} y T _{200R3}	: Tratamiento con 200 mL de biomasa fresca de <i>Chlorella sp</i>
T _{300R1} , T _{300R2} y T _{300R3}	: Tratamiento con 300 mL de biomasa fresca de <i>Chlorella sp</i>
TRH	: Tiempo de retención hidráulica

RESUMEN

La investigación tuvo como objetivo evaluar el efecto de la densidad poblacional de *Chlorella sp* en la remoción de acetaminofén del efluente de la planta de tratamiento de aguas residuales de Celendín, Cajamarca, 2021; fue de tipo experimental de finalidad aplicada, inició con la identificación, mantenimiento y aclimatación de cepas de *Chlorella sp*, implementado en un sistema de tratamiento de seis fotobioreactores control y nueve fotobioreactores de tratamiento, volumen 1 litro, luz directa con intensidad de 2000 Lux, fotoperiodo 12:12 horas, temperatura promedio 21,20 °C; pH promedio 7,23; oxígeno disuelto promedio 16,6 mgO²L⁻¹; inyección de aire y agitación con caudal de 10 Lmin⁻¹; análisis y validación del método analítico de determinación cuantitativa - cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) en el laboratorio de bioquímica de la Universidad Peruana Cayetano Heredia. Se aplicó tratamientos con 100 mL, 200 mL y 300 mL de *Chlorella sp* con una densidad poblacional inicial de 2,1x10⁶ cel mL⁻¹ para todos los tratamientos, llegando a densidades de 2,9x10⁶ cel mL⁻¹, 3,4x10⁶ cel mL⁻¹ y 4,2x10⁶ cel mL⁻¹; tratamientos T₁₀₀ promedio general de 0,711 mgL⁻¹ y remoción de 81,06%; tratamiento T₂₀₀ promedio general de 0,273 mgL⁻¹ y remoción de 92,72%; tratamiento T₃₀₀ promedio general de 0,085 mgL⁻¹ y remoción de 97,72%; la remoción se expresa como porcentaje respecto a la adición inicial de acetaminofén (4 mg L⁻¹). Con los resultados obtenido en la investigación se concluye que existe una relación directamente proporcional definida por mayor densidad poblacional de *Chlorella sp* mayor remoción del acetaminofén.

Palabras clave: *Chlorella sp*, acetaminofén, aguas residuales, contaminación.

ABSTRACT

The objective of the research was to evaluate the effect of the population density of *Chlorella sp* on the removal of acetaminophen from the effluent of the wastewater treatment plant of Celendín, Cajamarca, 2021; It was of an experimental type of applied purpose, it began with the identification, maintenance and acclimatization of *Chlorella sp* strains, implemented in a treatment system of six control photobioreactors and nine treatment photobioreactors, volume 1 liter, direct light with intensity of 2000 Lux, photoperiod 12:12 hours, average temperature 21.20 °C; average pH 7.23; average dissolved oxygen 16.6 mgO₂ L⁻¹; air injection and stirring with a flow rate of 10 Lmin⁻¹; analysis and validation of the analytical method for quantitative determination - high performance liquid chromatography (HPLC) in the biochemistry laboratory of the Universidad Peruana Cayetano Heredia. Treatments with 100 mL, 200 mL and 300 mL of *Chlorella sp* were applied with an initial population density of 2.1x10⁶ cel mL⁻¹ for all treatments, reaching densities of 2.9x10⁶ cel mL⁻¹, 3.4x10⁶ cel mL⁻¹ and 4.2x10⁶ cell mL⁻¹; T100 treatments general average of 0.711 mgL⁻¹ and removal of 81.06%; treatment T200 general average of 0.273 mgL⁻¹ and removal of 92.72%; treatment T300 general average of 0.085 mgL⁻¹ and removal of 97.72%; the removal is expressed as a percentage with respect to the initial addition of acetaminophen (4 mg L⁻¹). With the results obtained in the investigation, it is concluded that there is a directly proportional relationship defined by a greater population density of *Chlorella sp*, greater removal of acetaminophen.

Key words: *Chlorella sp*, acetaminophen, wastewater, pollution.

CAPÍTULO I

INTRODUCCIÓN

Hoy en día existe una gran preocupación por el tratamiento de nuestros desechos entre ellos las aguas residuales y más aún sobre los problemas de contaminación ambiental y toxicidad causada por ciertos compuestos químicos derivados del petróleo tales como los hidrocarburos aromáticos policíclicos, policlorobifenilos (PCB) y las dioxinas; sin embargo, desde ya algunos años, se inició a hablar de contaminantes emergentes, entendidos como contaminantes inexplorados o no reconocidos como tales, su presencia en el ambiente no es necesariamente nueva pero sí la preocupación por su posible impacto que pueden generar en el medio (iAgua Magazine, 2014).

Los contaminantes emergentes, como los fármacos o principios activos de fármacos, generan una considerable preocupación, el estudio de los contaminantes emergentes es una de las prioridades de investigación de los principales organismos relacionados a la protección de la salud pública y medioambiental, tales como la OMS, EPA o la Comisión Europea (Barceló y López de Alda, 2018); según ASHP (2017) la excreción renal del acetaminofén es de 85 - 90 %, los ingredientes o compuestos farmacéuticos activos de los fármacos pueden integrarse en el ambiente por procesos de producción, uso o eliminación, la existencia de estos en los ecosistemas naturales puede perturbar la vida silvestre por la modificación biológica que ejercen o por el efecto de bioacumulación y potencial tóxico en los organismos vivos, convirtiéndose en un problema progresivo para tomarlo en consideración y realizar acciones inmediatas para su mitigación (EMEA 2018); el problema se acentúa más aún que los contaminantes emergentes, entre ellos los fármacos, son productos que tiene características de persistencia en el ambiente.

En Perú, al igual que en otros países, no se cuenta con normativa que regule la contaminación con fármacos específicamente del acetaminofén, no se realiza el monitoreo, control o evaluación sobre las concentraciones de este medicamento en el recurso hídrico, suelos y mucho menos se realiza el monitoreo y control en aguas residuales; el tratamiento de aguas residuales a través de métodos convencionales no son completamente eficientes, habiendo estudios que concluyen en que hay contaminantes

que persisten sin alteración alguna aún después de haber pasado por tratamientos terciarios, siendo indispensable la identificación y evaluación de la eficiencia de otras tecnologías en el tratamiento de aguas residuales, con el fin de presentar alternativas eficientes en la remoción de contaminantes emergentes, viables económicamente, energéticamente, técnicamente y ambientalmente (Gil, 2012).

En la realidad, el uso y consumo de acetaminofén (N-(4-hidroxifenil) acetamida), por ser un analgésico de uso cotidiano y a gran escala para tratar dolores de cabeza, dientes contusiones, quemaduras por exposición al sol y fiebre, su uso es masivo, agudizándose mucho más por la cultura de automedicación y el expendio o venta libre en las boticas y farmacias locales, según estudios realizados por la sociedad estadounidense de farmacéuticos del sistema de salud – ASHP, determina que la excreción renal del acetaminofén es superior al 85 %, lo que significa que el N-(4-hidroxifenil) acetamida va a parar a través de las redes de alcantarillado directamente en las plantas de tratamiento de aguas residuales en su forma química o sus derivados, mucho más, que durante el proceso de tratabilidad no hay un tratamiento específico para productos químicos especialmente fármacos, que por su composición química de estos fármacos no se encuentran biodisponibles limitando la capacidad biodegradadora de los microorganismos responsables de la depuración de aguas residuales, asumiéndose que en su forma química o sus derivados estas van a parar a los cuerpos hídricos alterando la flora y fauna acuática.

En el Perú, se cuenta con escasa investigación científica sobre remoción de acetaminofén en matrices de aguas residuales haciendo uso de la biotecnología, lo que justifico el planteamiento de la siguiente interrogante ¿Cuál es el efecto de la densidad poblacional de *Chlorella sp* en la remoción de acetaminofén del efluente de la planta de tratamiento de aguas residuales de Celendín, Cajamarca, 2021?, contrarrestando la hipótesis que la densidad poblacional de *Chlorella sp* está directamente relacionada con la remoción de acetaminofén del efluente de la planta de tratamiento de aguas residuales de Celendín, Cajamarca, 2021; a fin de investigar una alternativa de solución para el tratamiento de aguas residuales contaminadas con acetaminofén producto de su uso, consumo, eliminación y excreción que según la ASHP (2017) la excreción renal del acetaminofén es de 85 - 90 %; en la presente investigación se tuvo como objetivo general determinar el efecto de la densidad poblacional de *Chlorella sp* en la remoción de acetaminofén del efluente de la planta de tratamiento de aguas residuales de Celendín, Cajamarca, 2021, y como objetivos específicos se planteó realizar la determinación de la

concentración de acetaminofén en el efluente de la planta de tratamiento de aguas residuales de Celendín, evaluar la concentración de oxígeno disuelto (OD), estimar los parámetros fisicoquímicos de temperatura, pH, tiempo de retención hidráulica en cada fotobiorreactor de tratamiento y determinar la remoción de acetaminofén en el sistema de fotobiorreactores, a través de la implementación de un sistema de tratamiento con microalga *Chlorella sp* a diferentes concentraciones para evaluar la remoción de 4 mgL⁻¹ de acetaminofén además de un control negativo y un control positivo en el sistema de tratamiento, utilizando como medio de cultivo el efluente de la planta de tratamiento de aguas residuales de Celendín.

La investigación se encuentra dividida en los siguientes capítulos:

Capítulo I: Introducción, que enmarca la justificación, problema, objetivos e hipótesis de investigación.

Capítulo II: Marco teórico, desarrolla los antecedentes de la investigación y bases teóricas.

Capítulo III: Materiales y métodos.

Capítulo IV: Resultados y discusión.

Capítulo V: Conclusiones.

Capítulo VI: Lista de referencias.

Capítulo VII: Apéndices y anexos.

CAPÍTULO II

MARCO TEÓRICO

2.1. Antecedentes de la investigación

Escapa et al. (2017) en la investigación denominada “Evaluación comparativa de la eliminación farmacéutica de aguas residuales por las microalgas *Chlorella sorokiniana*, *Chlorella vulgaris* y *Scenedesmus obliquus*”, tuvieron como objetivo estudiar la eliminación de paracetamol (PAC) y ácido salicílico (SaC) por *Chlorella sorokiniana* en vista de su aplicación para el tratamiento de aguas residuales de la industria farmacéutica; para este propósito, se creó un fotobiorreactor de columna burbujeante utilizado para el cultivo de microalgas en un medio de cultivo estándar que contiene PAC o SaC, los resultados obtenidos mostraron que el crecimiento del cultivo fue significativamente mayor bajo la presencia de las drogas consideradas que el control positivo; por otra parte, la eliminación de productos farmacéuticos en el estado estacionario del proceso semicontinuo mostró eficiencias superiores al 69% de paracetamol y 98% de ácido salicílico; debajo una irradiancia de solo $370 \mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$, el rendimiento cuántico alcanzó valores altos para todas las tratamientos debido a la alta concentración de biomasa lograda, de alguna manera, el rendimiento cuántico para SaC fue 1,4 veces mayor que los otros tratamientos; se concluyó que se pueden aplicar microalgas para la eliminación de altas concentraciones de paracetamol y salicílico de las aguas residuales.

Escapa et al. (2016) en su investigación titulada “Paracetamol y eliminación de ácido salicílico a partir de agua contaminada por microalgas”, tuvo como objetivo crecimiento de biomasa, la eliminación farmacéutica y la eficiencia de conversión de luz de *Chlorella sorokiniana* en presencia de paracetamol (PC) y ácido salicílico (SaC) fueron evaluados y comparados en dos diferentes concentraciones de estos productos farmacéuticos (I: 25 mg l^{-1} , II: 250 mg l^{-1}); las microalgas eran resistentes a estas concentraciones y, por otra parte, su crecimiento fue significativamente estimulado ($p \leq 0,05$) bajo estos fármacos (concentración de biomasa aumentó por encima de 33% PCI, 35% SaCI, 13% PCII y 45% SaCII, respecto a sus controles positivos). En el estado estable del cultivo semicontinuo, *C. sorokiniana* mostró eficiencias de eliminación superiores al 41% y 69% para PCI y PCII, respectivamente; y por encima del 93% y el 98% para SaCI y SaCII,

respectivamente. Bajo una irradiancia de $370 \mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$, rendimientos cuánticos más altos se alcanzaron por microalgas bajo la presencia de drogas, ya sea en dosis I o II, que por los respectivos controles positivos. Estos resultados apuntan a *C. sorokiniana* como un sólido de deformación para la biorremediación de paracetamol y aguas residuales concentradas de ácido salicílico.

Matamoros et al. (2015) en su investigación titulada “Evaluación de los mecanismos implicados en la eliminación de contaminantes emergentes por microalgas de las aguas residuales: Un estudio a escala de laboratorio”; que consistió en la implementación de reactores discontinuos aireados (2,5 L) alimentadas ya sea con las aguas residuales urbanas o sintético se inocularon con microalgas (dominados por *Chlorella sp.* y *Scenedesmus sp.*) para eliminar la cafeína, ibuprofeno, galaxolide, fosfato de tributilo, 4-octilfenol, tris fosfato (2-cloroetil) y la carbamazepina durante 10 días de incubación; reactores no aireado y reactores oscuridad se utilizaron como controles; las microalgas creció a una tasa de 0.25d^{-1} con la eliminación completa de N-NH_4 durante el curso del experimento; después de 10 días de incubación, hasta el 99% de los microcontaminantes con una constante de la ley de Henry superior a $3 \times 10^{-1} \text{ Pa m}^3 \text{ mol}^{-1}$ (es decir, 4-octilfenol, galaxolide, y tributil fosfato) se eliminaron por volatilización debido al efecto de arrastre con aire; considerando que la biodegradación era eficaz para eliminar el ibuprofeno y la cafeína, la carbamazepina y el tris (2-cloroetil) fosfato se comportó como compuestos recalcitrantes; el uso de microalgas fue demostrado ser relevante para el aumento de la eficiencia de eliminación de biodegradación de ibuprofeno en un 40% y la reducción de la fase de retardo de cafeína por 3 días; además, la biodegradación enantioselectiva de S-ibuprofeno sugirió un proceso de eliminación frecuente biótico, que fue apoyada por la identificación de carboxi-ibuprofeno e hidroxí -ibuprofeno.

Escapa et al. (2015) en la investigación denominada “Eliminación de nutrientes y productos farmacéuticos de las aguas residuales por cultivo y cosecha de *Chlorella sorokiniana*”, tuvo como objetivo determinar el potencial de biorremediación de *Chlorella sorokiniana* para eliminar el paracetamol y el ácido salicílico a partir de agua y si la presencia de estos productos farmacéuticos afectó el crecimiento de microalgas, y la evaluación de nitratos y fosfatos; se utilizó la cepa de microalga *Chlorella sorokoriana*, inoculándola para el experimento, se cultivó en 250 mL en matraces Erlenmeyer, las condiciones de crecimiento se mantuvieron constantes; los experimentos fueron inoculados con el mismo volumen de microalgas pre-cultivadas para asegurar la misma

concentración inicial, aproximadamente $3,10^6$ células mL^{-1} ; se llevaron a cabo dos tipos de experimentos: medio de cultivo inoculado con 25 mgL^{-1} de paracetamol y medio de cultivo inoculado con 25 mgL^{-1} de ácido salicílico, en cada caso, los ensayos también incluyó un control positivo con medio de cultivo inoculado (C +) y el control negativo correspondiente con 25 mgL^{-1} de paracetamol (C PAGES-) o 25 mgL^{-1} de ácido salicílico (C SA-); el método analítico utilizado fue el de concentración de biomasa, determinado por densidad óptica a 680 nm, por espectrofotometría y verificado en peso seco, mediante el filtrado de 10 ml de cultivo a través de un filtro Whatman de 0,45 micras y lavado con 20 ml de HCl (0,5 M) para disolver precipitados sales, a continuación, el filtrado se secó en un horno a $80 \text{ }^\circ\text{C}$ durante 24 horas. Concluyéndose que el ácido salicílico al comienzo del estudio, tuvo una respuesta retardada; luego de forma progresiva la cinética de eliminación fue mucho más rápida para el ácido salicílico que para el paracetamol, las tasas de eliminación revelaron diferencias significativas ($P > 0,05$), con valores de 2,3 veces mayor para ácido salicílico, alcanzando su máxima eliminación con sólo 4 días de tiempo de cultivo, las eficiencias encontradas, se estiman por encima del 67% para el paracetamol y el 73% para el ácido salicílico.

De Wilt et al. (2016), en su investigación “Eliminación de fármacos en aguas residuales de la ciudad de Canarias, por utilización de microalgas”; tuvieron como objetivo general, determinar la eficiencia de microalgas en la eliminación de fármacos provenientes de las aguas residuales de la ciudad de Canarias; a través de una metodología de estanques donde cultivaron la microalga *Chlorella sorokiniana*, por tiempos de retención de 48 horas; logrando concluir que la eliminación es por adsorción mediante cultivos de *Chlorella sorokiniana* es mayor al 20% para fármacos como diclofenaco, ibuprofeno, paracetamol, metropopol.

Parladé et al. (2017), en su investigación titulada “Efecto de las condiciones de cultivo sobre la eliminación β -estradiol en laboratorio y en planta piloto fotobiorreactores por un consorcio algal-bacteriano tratamiento de aguas residuales urbanas”, este estudio tuvo como objetivo evaluar la capacidad de la biomasa del fotobiorreactor nativo para eliminar el 17β -estradiol en condiciones de interior y exterior, al mismo tiempo, se evaluaron los *Scenedesmus*. Los resultados muestran que la eliminación casi completa ($> 93,75\%$) de la hormona 17β -estradiol se puede lograr en el sistema en condiciones estacionales favorables, aunque estas condiciones influyen en gran medida en las concentraciones de biomasa y la diversidad microbiana; incluso en las duras condiciones de bajas

temperaturas e irradiación solar, el consorcio establecido eliminó más del 50% del contaminante en 24 h. Las especies del género *Chlorella* se mantuvieron estables durante toda la operación, el análisis de diversidad microbiana reveló que poblaciones variadas y distribuidas uniformemente estimulan las tasas de eliminación. Los ensayos de bioaumentación demostraron que la entrada de biomasa adicional da como resultado una mayor remoción general y disminuye el rendimiento por mg de biomasa.

Kalyva (2017), en su investigación titulada “El destino de los productos farmacéuticos en el entorno - Una revisión”, realiza una descripción detallada de los productos farmacéuticos y su historia, su destino en el medio ambiente, ocurrencia y exposición en el medio, cantidades potenciales, fuentes de generación, transporte, contaminación en ambiente terrestres, efectos de riesgo e impactos en las poblaciones y algunas soluciones al problema, haciéndose un resumen de los conocimientos actuales en todo el ciclo de vida de las sustancias farmacéuticas, a partir de su exposición (fuentes) y el destino de sus efectos sobre el medio ambiente natural; dado que los efectos negativos de varios medicamentos junto con los daños medioambientales que conllevan ahora son conocidos, se puede sugerir que las compañías farmacéuticas hacen productos más ecológicos para reducir estos efectos en el medio ambiente terrestre y acuática; conllevando a sugerir la mejorar la gestión ambiental farmacéutica a nivel mundial, tales como metodologías para sistemas de monitoreo, que hay que poner en su lugar para la recogida de datos consistente y por último, un área con mayor necesidad de investigación es la química verde, que podría reducir o incluso eliminar los peligros potenciales de los compuestos farmacéuticos que entran en el medio ambiente, con independencia de la fuente de entrada.

2.2. Bases teóricas

2.2.1. Microalgas

Son microorganismos eucariotas, fotoautótrofos, es decir que obtienen energía de la luz y sintetizan su propio alimento, contienen clorofila y otros pigmentos accesorios que les otorgan una gran eficiencia fotosintética (Hernández, 2014). Se identifican por presentar un crecimiento exponencial, las células se reproducen en un tiempo de 1 a 10 días, tienen un alto contenido lipídico (mayor al cincuenta por ciento en peso de materia seca) y utilizan menos superficie para su cultivo (Santos, et al. 2014).

López, et al. (2015) señala que las microalgas ostentan una gran capacidad de fitorremediación en la eliminación o biotransformación de contaminantes de un medio líquido, estos contaminantes son asimilados por la biomasa algal.

Las microalgas constituyen un enorme potencial para el aprovechamiento como una tecnología limpia y compatible con el ambiente para tratar efluentes contaminados debido a su gran capacidad de fitorremediación o biorremediación, y es ahí donde adquieren un gran protagonismo, ya que algunas investigaciones han demostrado la absorción eficiente principalmente de fármacos o compuestos inorgánicos desde medios líquidos o gaseosos, incorporándolos en su organismo para la generación de biomasa (Markou y Georgakakis, 2011); el tratamiento de aguas residuales con cultivo de microalgas como organismos vivos, involucran una serie de parámetros que deben ser considerados, evaluados, determinados y medidos pero que dependerá del fin de implementación o uso de estos organismos.

2.2.2. *Chlorella sp*

Chlorella sp, es un alga unicelular de color verde, de forma esférica, con un diámetro que es entre cien y mil veces menor a un milímetro. La coloración verde es atribuida a los cloroplastos, que son las estructuras delegadas de realizar la fotosíntesis, esta característica le da nombre *Chlorella* al género, que significa pequeña verde, se reproduce muy rápidamente y de forma asexual, usa el carbono que obtiene de la fotosíntesis, agua, luz y mínimas concentraciones de minerales (CEIBAL, 2016). El género *Chlorella* es comercialmente importante debido a su fácil cultivo y alto valor nutricional, y también porque tienen alta tolerancia a la salinidad, pH, luminosidad y temperatura (López, et al. 2015).

Morfológicamente es una célula esférica de dos a diez micras de diámetro, contiene pigmentos verdes fotosintetizadores de clorofila a y b en su cloroplasto, es una microalga con núcleo bien definido (Navinta, 2019), presenta crecimiento rápido, gran potencial de tratamiento de aguas residuales y tolerante a condiciones ambientales típicas de las aguas residuales para asimilar y tratar eficientemente removiendo contaminantes orgánicos e inorgánicos presentes en ellas, en la siguiente tabla se presenta su clasificación taxonómica y sus características las representativas.

Tabla 1

Clasificación taxonómica y características de Chlorella vulgaris.

Dominio	:	Eukaryota
Reino	:	Protista
División	:	Chlorophyta
Clase	:	Trebouxiophyceae
Orden	:	Chlorella
Familia	:	Chlorella
Género	:	Chlorella
Fecha de nacimiento	:	Hace 2,5 mil millones de años
Forma	:	Esférica
Tamaño	:	2-10 μm de diámetro
Hábitat	:	Agua dulce
Color	:	Verde
Descubridor	:	M.W. Beijerinck, biólogo holandés
Aplicación	:	Suplemento alimenticio y fitorremediación de aguas contaminadas

Fuente: Céspedes (2019).

2.2.3. Cinética de crecimiento de *Chlorella sp*

Para analizar la cinética de crecimiento de cultivos de microalgas es necesario obtener la velocidad específica de crecimiento celular (μ) y la productividad volumétrica de biomasa (P_b); la concentración de biomasa (C_b) se expresa en masa seca por unidad de volumen de cultivo (g/L); la velocidad específica de crecimiento (μ) es una medida de la capacidad de generación de biomasa que mide la cantidad de gramos de biomasa que es capaz de generar cada gramo de biomasa en la unidad de tiempo: (Prieto, 2020)

$$\mu = \frac{1}{C_b} \cdot \frac{dC_b}{dt} \quad [5]$$

Siendo:

μ : velocidad específica de crecimiento, g biomasa formada/(g biomasa seca·día), o simplemente 1/día

C_b : concentración de biomasa, g/m³

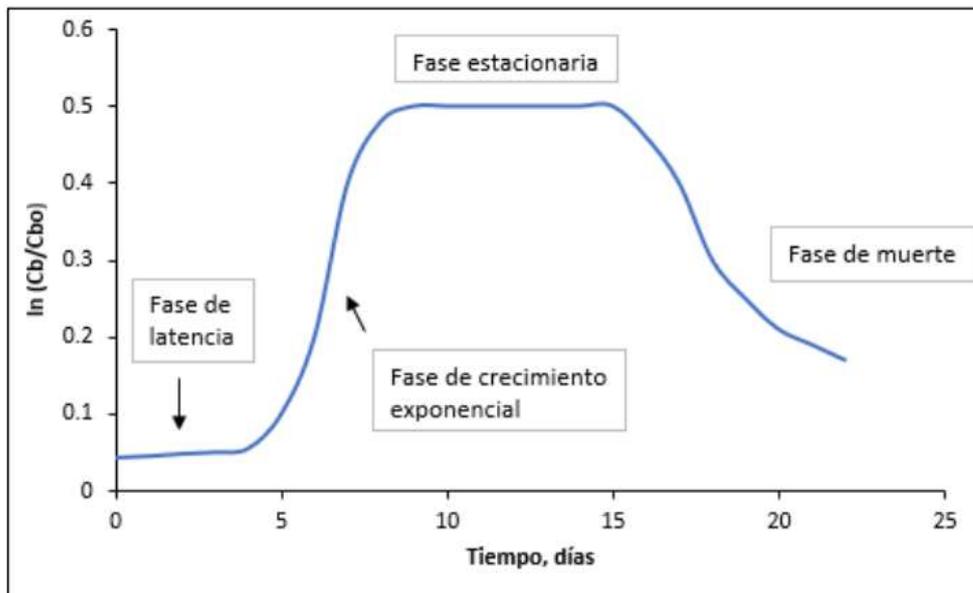
dC_b/dt : variación de la concentración de biomasa respecto al tiempo, g/(m³día)

En el modo de cultivo discontinuo se distinguen cuatro etapas de crecimiento (Castro, 2018):

- ✓ Fase de latencia o fase lag: Ocurre después de la inoculación. En esta etapa no tiene lugar la replicación de ADN, y no se producen nuevas células. Las células se adaptan a su entorno.
- ✓ Fase de crecimiento exponencial: las células se multiplican a la velocidad máxima para las condiciones ambientales determinadas, ya que no hay limitación de nutrientes.
- ✓ Fase estacionaria: cuando se agotan los nutrientes, el crecimiento se detiene, por lo que la población celular permanece inactiva (la renovación de nuevas células se compensa con la muerte de células viejas).
- ✓ Fase de muerte: el sustrato se agota y el número de células disminuye porque la tasa de muerte es mayor que la tasa de producción de nuevas células.

Figura 1

Crecimiento celular en discontinuo



Fuente: Castro, 2018.

2.2.4. Contaminantes emergentes

Se describe como contaminante emergente a todo elemento inicialmente desconocido o no reconocido, su persistencia en el ambiente no es obligatoriamente nueva, pero si preocupa los posibles efectos en el mismo, la identificación y determinación de estos

elementos en el ambiente ha sido posible debido al desarrollo de tecnologías analíticas recientemente que permiten su cuantificación, entre los contaminantes emergentes presentes en el agua destacan los fármacos; la fuente principal de entrada de estos contaminantes en el ambiente acuático son las aguas residuales (iAgua, 2014); Arbeláez (2016) en la presente tabla describe los principales contaminantes emergentes.

Tabla 2

Contaminantes emergentes, subgrupos y compuestos de interés

Contaminantes emergentes	Sub grupo	Compuestos de interés emergente
fármacos	Antibióticos	Lincosamidas, macrólidos, sulfamidas, tetraciclinas, quinolonas
	Analgésicos y antiinflamatorios	Paracetamol (acetaminofén), ácido acetil salicílico, ibuprofeno, diclofenac, oxicam.
	B-bloqueantes	Metoprolol, propranolol, timolol
	Medios de contraste de rayos X	Iopromide, iopamidol, diatrizoato
	Esteroides y hormonas	Estradiol, estrona, estriol, dietilestilbestrol
Productos de tocador	Parabenos	α -olefin sulfonato de sodio
	Filtros solares	Lauril monoetanolamida
	Alquilfenoles	Nonilfenol, octilfenol
Aditivos y agentes industriales	Benzotriazoles	Benzotriazol, toliltriazol
	Agentes quelantes	EDTA
Edulcorantes		Sacarina, sucralosa, aspartamo, ciclamato, stevia, NHDC
Drogas de abuso	Cocaínicos	Cocaína, benzoilecgonina
	Opiáceos	Morfina, codeína

Fuente: Arbeláez (2016).

2.2.5. Paracetamol (N-(4-hidroxifenil) acetamida)

El paracetamol, denominado también acetaminofén o acetaminofeno, es un analgésico y antipirético que se usa principalmente para tratar la fiebre y el dolor, se vende en combinación con otros principios activos, como en los antitusígenos y opiáceos, donde el paracetamol se usa para aplacar el dolor muy grave, como el dolor oncológico o tras una cirugía, se administra por vía oral, vía rectal o intravenosa, se presenta en forma de gotas, supositorios, comprimidos o cápsulas; se encuentra en la lista de medicamentos básicos ineludibles en todo sistema de salud y de acceso libre determinados por la OMS (ASHP, 2017).

El ministerio de salud lo cataloga al paracetamol e ibuprofeno como los dos analgésicos más comunes y populares en el mundo, el uso cotidiano y a gran escala de paracetamol (N-(4-hidroxifenil) acetamida), para tratar el dolor de cabeza, dientes, contusiones, fiebre y quemaduras por exposición al sol lo que ha conllevado a ser un fármaco de primer uso, mucho más en países latinoamericanos, y especialmente en el Perú donde se tiene una cultura de automedicación.

Su excreción es a través de la leche materna, cruza barrera placentaria y por metabolismo hepático; su tiempo medio es de uno a cuatro horas; tiempo hasta el efecto máximo de uno a tres horas y principalmente excreción urinaria, principalmente como glucurónido de acetaminofén (MINSA, sf); la ASHP, 2017 en la tabla 3 nos presenta las características físicas y químicas del acetaminofén.

Tabla 3

Características físicas y químicas del paracetamol (acetaminofén)

Nombre (IUPAC) sistemático	
N-(4-hidroxifenil) acetamida	
Identificadores	
Número CAS	103-90-2
Código ATC	N02BE01
Datos químicos	
Fórmula	C ₈ H ₉ NO ₂
Peso mol.	151,17 g mol ⁻¹
Datos físicos	
Densidad	1,263 g cm ⁻³
P. de fusión	169 °C (336 °F)
Solubilidad en agua	12,78 mg mL ⁻¹ (20 °C)
Farmacocinética	
Biodisponibilidad	63-89 %
Unión proteica	10-25 %
Metabolismo	90-95 % Hepático
Vida media	1 – 4 h
Excreción	Renal (85-90 %)
Datos clínicos	
Vías adm.	Oral, rectal, intravenosa

Fuente: adaptado de ASHP, 2017

2.2.6. Los fármacos como contaminantes emergentes

Los fármacos una vez administrados, puede excretarse del organismo sin sufrir ninguna transformación, o pueden metabolizarse mediante reacciones de oxidación, reducción, hidrólisis y alquilación, o bien formar conjugados más polares e hidrofílicos que se excretan en la orina o la bilis (Heberer, 2012). La excreción de estos fármacos, va a depender de sus características y principios activos (Sorensen et al., 2015).

Dependiendo de las propiedades físicoquímicas de los fármacos y del cuerpo receptor, estos contaminantes pueden llegar a las aguas subterráneas o permanecer y acumularse en el suelo, afectando la salud de los ecosistemas y las cadenas alimenticias. Estudios recientes han concluido que los métodos de tratamiento tradicionales no pueden eliminar de manera efectiva los productos farmacéuticos de las aguas residuales, detectados estos compuestos y sus metabolitos en los cuerpos receptores y efluentes (Drewes et al., 2021).

Los productos farmacéuticos, metabolitos o productos de degradación debido a su alta polaridad y baja volatilidad, la mayoría de los productos farmacéuticos son más susceptibles de ser transportados a la columna de agua (Zhang, et al. 2014).

Los principales productos farmacéuticos rastro siguen a las aguas superficiales es a través de los efluentes domésticos, industriales o de hospital y a través de los efluentes de plantas de tratamiento de aguas residuales (PTAR), donde los productos farmacéuticos se eliminan de manera incompleta; de hecho, la investigación sugiere que hasta un 90% del residuo de la droga se puede encontrar en el efluente que sale de la planta de tratamiento (Cooper, et al. 2008); la excreción combinada de ingredientes farmacéuticos activos puede tener lugar a través de la orina y las heces, que es la ruta directa a través del cual medicamentos entran en el medio ambiente; la ruta indirecta se considera que es la eliminación de los medicamentos no utilizados o sobrantes mediante el lavado en el alcantarillado (Daughton, 2009).

2.2.7. Efectos y riesgos por la presencia de fármacos en el ambiente

Los fármacos, una vez vertidos en el ambiente, pueden tener efectos nocivos desconocidos sobre los organismos vivos, estos productos han sido desarrollados para actuar sobre mecanismos metabólicos y moleculares en personas y animales, al

introducirse en el ambiente, pueden actuar por el mismo mecanismo en los animales que tengan órganos, tejidos, células o biomoléculas similares, sin embargo, en organismos inferiores los modos de acción pueden darse de muchas formas diferentes, además, estos fármacos tienen la capacidad de acumularse en los tejidos animales, por ejemplo, concentraciones de ibuprofeno y diclofenaco identificados en el plasma, riñones e hígado de diversos peces (Brown, et al. 2007).

Actualmente, los efectos generados por fármacos en el ambiente no son conocidos detalladamente, las cantidades encontradas en las aguas, no suelen ser de toxicidad aguda para los organismos acuáticos, pero el hecho de que puedan estar expuestos a estos compuestos durante largos periodos de tiempo influye mucho en la toxicidad crónica, y este riesgo se incrementa porque estos contaminantes suelen estar presentes en el medio ambiente, resultando en un efecto conjunto o sinérgico (Quinn, et al. 2009).

2.2.8. Aguas residuales

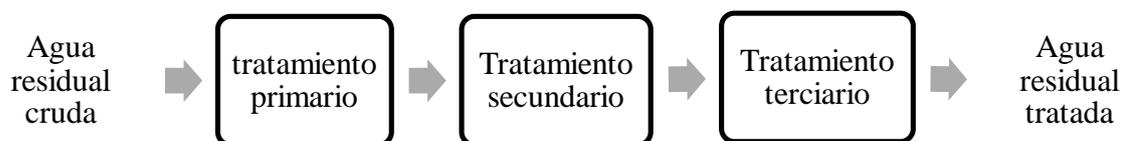
Las características originales de estas aguas han sido alteradas por la actividad humana y su calidad requiere un tratamiento previo antes de su reutilización, vertido a cuerpos de agua naturales o sistemas de alcantarillado (OEFA, 2012). El MVCS (2006), en la norma OS.090 conceptualiza las aguas residuales como aquellas que han sido utilizadas por una comunidad o industria y que contiene material orgánico o inorgánico, disuelto o suspendido. Romero (2004), lo define como Residuos de agua usada, que de alguna manera son vertidos al alcantarillado y transportados a través de la red de alcantarillado; además define a las aguas residuales domésticas (ARD) como los líquidos provenientes de las viviendas o residencias, edificios institucionales o comerciales e institucionales.

2.2.9. Tratamiento de aguas residuales

Consiste en una serie de procedimientos físicos, químicos y biológicos que tienen como fin remover contaminantes físicos, químicos y biológicos presentes en el agua generada por el uso humano. La finalidad del tratamiento es producir agua limpia y reutilizable en el ambiente y un residuo sólido o fango convenientes para la disposición o reúso (Ecured, 2008).

Figura 2

Procesos de tratamiento de aguas residuales



2.2.10. Mecanismos de biorremediación

Los mecanismos de biorremediación que se generan en la eliminación de contaminantes emergentes por aplicación de tratamiento con microalgas son la adsorción/absorción y la biodegradación; estos procesos de adsorción/absorción de contaminantes emergentes son condicionados principalmente por la estructura del compuesto farmacéutico, la especie de microalga que actuará como adsorbente/absorbente y de las condiciones de su medio (Norvill, Shilton & Guieysse, 2016). Además, la adsorción parece ser un paso previo en la biodegradación de algunos contaminantes; la biodegradación de contaminantes emergentes por medio de microalgas puede tener lugar de forma directa mediante metabolitos heterótrofos (Neilson & Lewin, 2016); o mediante la acción de enzimas extracelulares.

Además, estos contaminantes se pueden descomponer aumentando la cantidad de oxígeno disuelto en el agua, mediante la fotosíntesis cambiando el nivel de pH o, en las condiciones apropiadas, mediante una relación simbiótica entre bacterias (Muñoz, 2016).

2.2.11. Tratamiento de aguas residuales con microalgas

El uso de microalgas en el tratamiento de aguas residuales se remontan a los años 60, hoy, la implementar como un sistema a escala industrial no ha sido posible, siendo necesario superar algunas limitaciones que restringen su eficacia en los sistemas de tratamiento convencional, en la actualidad, no se puede implementar como un sistema de tratamiento con microalgas de manera independiente, sino como una etapa dentro del sistema de tratamiento en una PTAR, ya sea como tratamiento secundario o terciario, que logre el cumplimiento con los valores máximos admisibles para aguas residuales y la eliminación de contaminantes emergentes; el cultivo de microalgas está determinado por

las características del agua residual y la presencia de nutrientes necesarios para el crecimiento de las microalgas, siendo estos principalmente carbono, N y P (Gómez et al., 2015).

Las microalgas se caracterizan por su alta eficiencia fotosintética, las altas tasas de crecimiento, amplia adaptabilidad y alto potencial para eliminar nutrientes inorgánicos de las aguas residuales; siendo el principal mecanismo de eliminación de nutrientes de algas es su absorción en la biomasa celular (Ritchmon, 2004). Una de las principales ventajas por la aplicación de microalgas como sistema de tratamiento frente a sistemas convencionales es la disminución de los costos energéticos, ya que a través de fotosíntesis se incrementa el oxígeno disuelto del agua, permitiendo reducir la aireación que supone un cuarenta y cinco al setenta y cinco % del costo total del proceso (Rosso, et al. 2008). Las microalgas de mayor uso en el tratamiento de aguas residuales y que son fácilmente identificables en cuerpos de agua natural, son las del género *Chlorella* y *Scenedesmus* debido a sus elevadas tasas de crecimiento y a su adaptación a diferentes medios o condiciones externas (Gómez et al., 2013). Además, es uno de los géneros que presentan mayor tolerancia a medios contaminados o efluentes de aguas residuales (Palmer, 2009).

2.3. Definición de términos básicos

2.3.1. Biorremediación

La biorremediación es la aplicación de microalgas en sistemas de tratamiento para la remoción o biotransformación de elementos tóxicos o dañinos (contaminantes), incluidos nutrientes, xenobióticos y CO₂ del agua residual, esta biotecnología es económica, práctica, sencilla y eficiente (Gómez et al., 2015).

2.3.2. Biotransformación

La biotransformación es un proceso a través del cual un elemento o sustancia de convierte (transforma) en otro subelemento debido a una acción química de un organismo; la biotransformación es un proceso primordial en el ciclo de vida de los organismos vivos, los nutrientes absorbidos; se convierten en elementos necesarios para el desarrollo funcional de estos organismos; en el caso específico de fármacos, es un metabolito terapéutico y no el propio principio activo del fármaco (Rosso, et al. 2008).

2.3.3. Metabolitos

Es un producto que da como resultado de la descomposición (metabolismo) de un fármaco por parte del cuerpo; sustancia que el cuerpo elabora o usa cuando descompone los alimentos, los medicamentos o sustancias químicas; o su propio tejido (Neilson & Lewin, 2016).

2.3.4. Fármacos

Se entiende por droga a una sustancia con una composición química conocida con precisión que es capaz de influir o cambiar algunas de las características fisiológicas de su usuario; si suficientes personas toman un fármaco, su dosis puede determinarse con precisión y sus efectos pueden comprenderse por completo (ASHP, 2017).

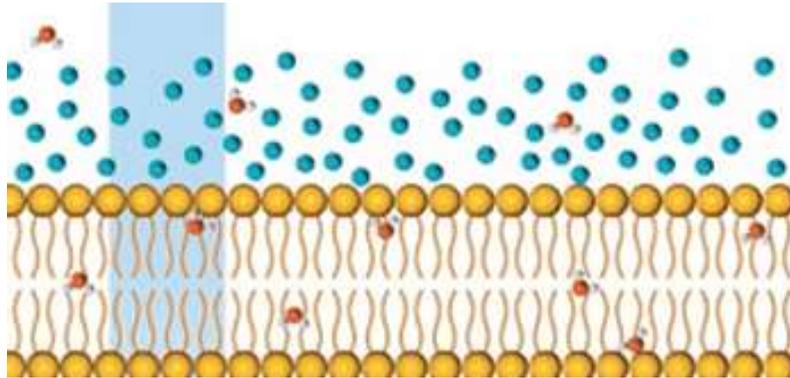
2.3.5. Adsorción

Es un proceso fisicoquímico en el que un contaminante, compuesto, sustancia o elemento (adsorbato) presente en un medio líquido o gaseoso, queda adherido a un microorganismo (adsorbente), en este caso no hay transferencia de masa, en el adsorbato

se crea una capa del adsorbente, debiéndose existir afinidad entre los grupos funcionales del microorganismo y el contaminante ya que es atraído por el microorganismo o enlazado por diferentes mecanismos fisicoquímicos (López, et al. 2015).

Figura 3

Proceso de adsorción de contaminantes

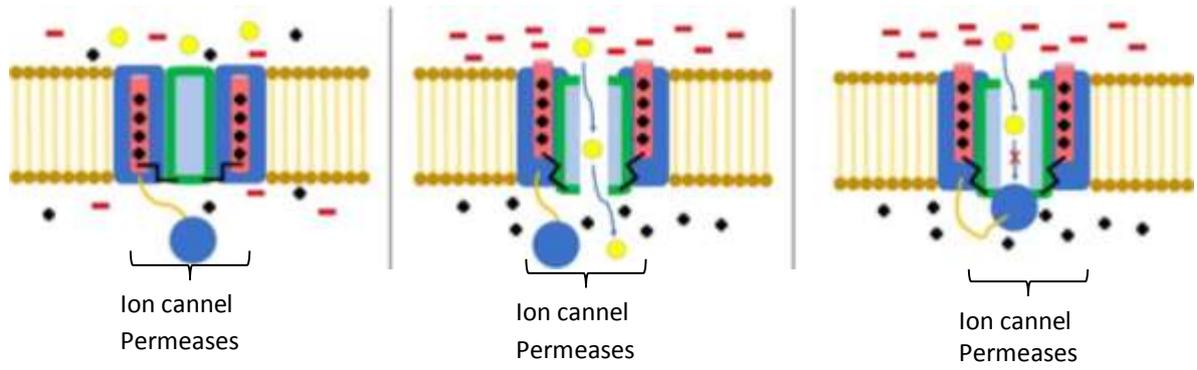


2.3.6. Absorción

La absorción es un proceso fisicoquímico en el que un contaminante, sustancia, elemento, compuesto, átomos, moléculas o iones pasan de una fase, ya sea, líquida o gaseosa a otra líquida o gaseosa. Es decir, se transfiere la materia de una fase A (absorbato) a otra fase B (absorbente) en la que queda disuelto o disperso; es un mecanismo de interacción entre la microalga y el contaminante a fin de degradarlo o transformarlo, la absorción se produce por un complejo formado entre iones y productos metabólicos generados por *Chlorella* a través de relaciones enzimáticas y transportadores “carrier” de carácter lipídico, los mecanismos cinéticos por relación lineal y saturación se manifiestan en el plasmalema de las células; en las membranas celulares de *Chlorella* se localizan bombas de protones, considerados como los responsables del transporte activo e indirectamente del intercambio de sustancias entre la microalga y su medio (López, et al. 2015).

Figura 4

Proceso de absorción de contaminantes



Fuente: Adaptado de López, et al. (2015)

CAPÍTULO III

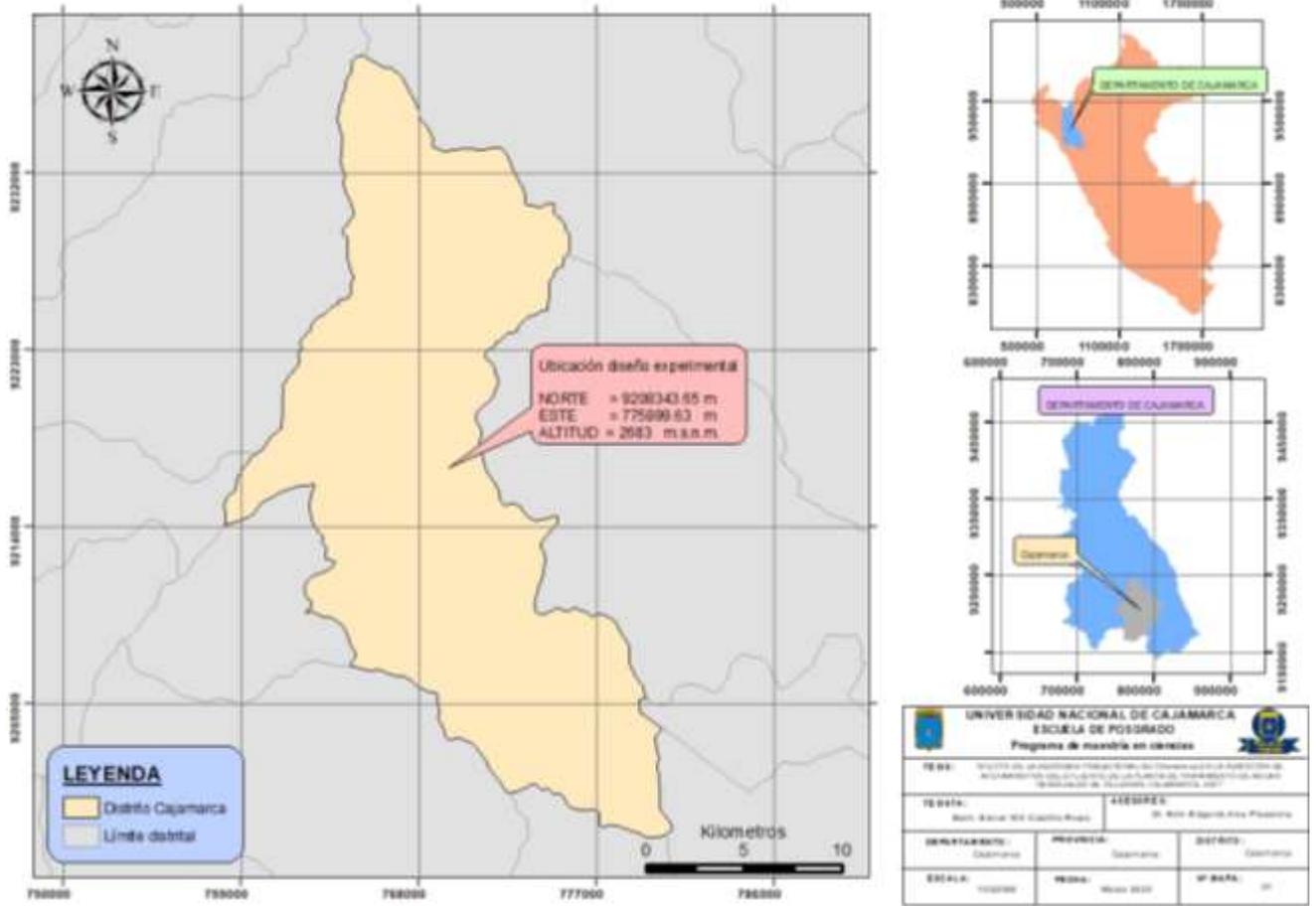
MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. Ubicación geográfica

La investigación se desarrolló en un área acondicionada en la Av. La Cantuta S/N ubicada en la ciudad de Cajamarca con las siguientes coordenadas: norte 9208343,65 m, este 775899,63 m, altitud 2683 msnm.

Figura 5

Ubicación del proyecto en la ciudad de Cajamarca



3.2. Materiales

3.5.1. Materiales de campo

- ✓ Probetas graduadas de PVC color transparente de 1000 mL.
- ✓ Bomba de inyección de aire de cuatro salidas Marca: RSelectrical, modelo: RS-9801.
- ✓ Manguera de silicona transparente 4 mm.
- ✓ Te de PVC 4mm.
- ✓ Válvulas reguladoras de aire de PVC 4mm.
- ✓ Difusores sumergibles de aire.
- ✓ Focos de iluminación de 36 watss marca: Philips modelo: Súper 80 36W/865 G13
- ✓ Agua residual de la PTAR – Celendín.
- ✓ GPS, marca: GARMIN, modelo: GPSmap76CSx.
- ✓ Cámara digital, marca: Samsung, modelo: WB850F
- ✓ Fichas de registro.
- ✓ Material de escritorio.

3.5.2. Materiales de laboratorio

- ✓ Acetaminofén Lote nro. 011911073 Report no. 0111071 (B)
- ✓ *Chorella sp.* CEPA UTEX 2714
- ✓ Balanza analítica Marca: Ohaus Modelo: Adventurer AX324
- ✓ Centrífuga Marca: Biobase Modelo: BK-THR20K-D
- ✓ pHmetro digital Marca: Hanna Instrument Modelo: pH&EC HI98129 y HI98130
- ✓ Termómetro ambiental de mercurio
- ✓ Microscopio óptico Marca: Olympus Modelo: CX23
- ✓ Cromatógrafo de fase líquida de alta resolución - HPLC-DAD Modelo: 1260
- ✓ Cámara de Neubauer de dos rejillas
- ✓ Azul tripán
- ✓ Matraz Erlenmeyer 1000 mL
- ✓ Frasco Winckler 250 mL
- ✓ Vasos de precipitado
- ✓ Algodón y papel aluminio
- ✓ F/2 Guillard's Algae Food – Part A

- ✓ F/2 Guillard's Algae Food – Part B
- ✓ Jeringas de 10 mL estériles
- ✓ Filtros para jeringa SIMPLEPURE PES 0,54 µm
- ✓ Filtros Milipore con un tamaño de poro de 0,54 µm
- ✓ Tubo de propileno, base cónica, tapa rosca, 15 mL
- ✓ Metanol

3.5.3. Materiales de gabinete

- ✓ Laptop Lenovo Intel Core i5
- ✓ Software IBM SPSS ®
- ✓ Microsoft Word 2010, Microsoft Excel 2010.
- ✓ Impresora, marca: Canon, modelo: ImageRunner 1435

3.3. Metodología

3.6.1. Diseño experimental

La investigación se desarrolló bajo un diseño estadístico completamente randomizado - DCA, con cinco tratamientos, incluye dos controles (C- y C+) y tres repeticiones de cada tratamiento respectivamente; se evaluó la efecto de la densidad poblacional de *Chlorella sp* (CEPA UTEX 2714 obtenido de la de la Universidad Nacional del Santa) en la remoción de acetaminofén del efluente de la planta de tratamiento de aguas residuales de la ciudad de Celendín en el año 2021, estableciéndose un sistema de tratamiento que consistió en la instalación de fotobiorreactores operando bajo las mismas condiciones.

3.6.2. Codificación de los tratamientos

Las muestras de agua residual recibidas tenían la codificación de la siguiente manera:

To: Agua residual + 4 mg acetaminofén tiempo inicial o cero

To 5D: Agua residual + 4 mg acetaminofén luego de 5 días

T_{100R1}: Agua residual + 100 mL de suspensión de *Chorella sp* + 4 mg acetaminofén

T_{100R2}: Agua residual + 100 mL de suspensión de *Chorella sp* + 4 mg acetaminofén

T_{100R3}: Agua residual + 100 mL de suspensión de *Chorella sp* + 4 mg acetaminofén

T_{200R1}: Agua residual + 200 mL de suspensión de *Chorella sp* + 4 mg acetaminofén

T_{200R2}: Agua residual + 200 mL de suspensión de *Chorella sp* + 4 mg acetaminofén

T_{200R3}: Agua residual + 200 mL de suspensión de *Chorella sp* + 4 mg acetaminofén

T_{300R1}: Agua residual + 300 mL de suspensión de *Chorella sp* + 4 mg acetaminofén

T_{300R2}: Agua residual + 300 mL de suspensión de *Chorella sp* + 4 mg acetaminofén

T_{300R3}: Agua residual + 300 mL de suspensión de *Chorella sp* + 4 mg acetaminofén

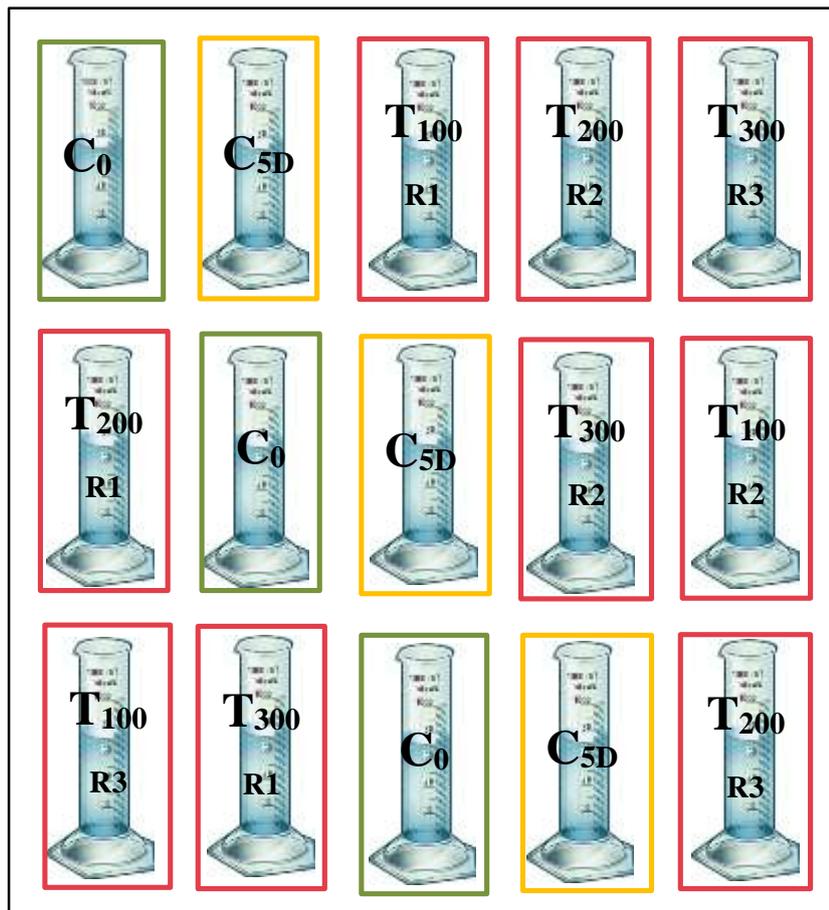
El sistema de tratamiento fue distribuido en un diseño estadístico completamente randomizado – DCA. Se contrastó la hipótesis con la realización de un análisis estadístico a través de prueba de normalidad, prueba de homogeneidad, F de Levene, análisis de varianza (ANOVA), prueba de Tukey y prueba de variación de medias de cada una de las variables que se plantearon en la investigación (el análisis estadístico se describe en los anexos).

3.6.3. Distribución de los tratamientos

La distribución del experimento se realizó conforme al siguiente diseño.

Figura 6

Diseño del sistema de fotobioreactores



3.6.4. Descripción del sistema de tratamiento

La investigación está dividida en tres fases fundamentales que marcan el avance o desarrollo de la ejecución, presentándose de la siguiente manera:

- Fase de campo
- Fase de laboratorio
- Fase de gabinete

a) Fase de campo

La fase de campo estuvo determinada por la adquisición de insumos, reactivos, materiales equipos e instrumentos necesarios para la realización de la investigación, a continuación, se describen las actividades desarrolladas en esta fase.

- Georreferenciación del punto de toma de muestra (efluente PTAR - Celendín) y área para instalación del experimento con fotobiorreactores en la Av. La Cantuta S/N - Cajamarca; la georreferenciación se realizó con el uso de un GPS Garmin GPSmap76CSx.
- Adquisición de acetaminofén Lote nro. 011911073 Report no. 0111071 (B), microalga *Chlorella sp*, probetas graduadas de PVC color transparente de 1000 mL, bomba de inyección de aire, manguera de silicona transparente 4 mm, Te de PVC 4mm, válvulas reguladoras de aire de PVC 4 mm, difusores sumergibles de aire, focos de iluminación de 36 watss, matraz Erlenmeyer 500 mL, vasos de precipitado, algodón y papel aluminio, F/2 Guillard's Algae Food – Part A, F/2 Guillard's Algae Food – Part B, jeringas de 25 mL estériles, filtros para jeringa SIMPLEPURE PES 0,54 μm , tubo de propileno base cónica tapa rosca de 15 mL, metanol y entre otros.

b) Fase de laboratorio

La fase de laboratorio esta diferenciada en tres etapas, la primera etapa consistió en el cultivo, escalamiento, mantenimiento y aclimatación de *Chlorella sp*, la segunda etapa de pesaje de acetaminofén y la tercera etapa que consistió en la puesta en marcha del experimento, monitoreo de parámetro de campos y análisis cuantitativos.

Etapa 1: Cultivo, escalamiento, mantenimiento y aclimatación de *Chlorella sp*

Para asegurar la calidad e inocuidad del cultivo se adquirió 1 litro de cultivo de *Chlorella sp* CEPA UTEX 2714 de la Universidad Nacional del Santa certificada por el Blgo. Gustavo Olivos, el cultivo madre tuvo una densidad poblacional de $2 \times 10^6 \text{ cel mL}^{-1}$ de *Chlorella sp*.

- Se realizó el cultivo, escalamiento y aclimatación del cultivo a las condiciones ambientales de laboratorio de aguas de la Universidad Nacional Autónoma de Chota y posteriormente se implementó en el sistema de fotobiorreactores de control y tratamientos.

- El cultivo madre de un litro *Chlorella sp* fue separado en 5 cantidades iguales de 200 mL aforados a 500 mL con agua potabilizada en matraces Erlenmeyer, el cultivo alcanzó la densidad de $2,1 \times 10^6$ cel mL⁻¹ a los 15 días, teniendo en cuenta el crecimiento exponencial de *Chlorella sp*; se repitió el proceso hasta alcanzar la cantidad de 2 litros.
- Al cultivo se adicionó F/2 Guillard's Algae Food – Part A y F/2 Guillard's Algae Food – Part B como medio de cultivo a razón de 5/1000 mL de cada complemento nutricional.

Composición F/2 Guillard's Algae Food – Part A

Ferric Chloride (Fe) 0.82%, Cobalt Chloride (Fo) 0,002%, Zinc Sulfate (Zn) 0,0037%, Copper Sulfate (Cu) 0,0017%, Manganese Chloride (Mn) 0.034%, Sodium Molybdate (Mo) 0,0009% y EDTa.

Composición F/2 Guillard's Algae Food – Part B

Sodium Nitrate (N) 9.33%, Monosodium Phosphate (P205) 2.0%, Thlamine Hydrochloride (B1) 0,07%, Vitamin B12 0,0002% y Biotin 0,0002%.

- Los cultivos se mantuvieron a condiciones constantes en laboratorio, a una temperatura promedio de 21,20 °C, luminosidad con fluorescentes de luz blanca de 36 Wattss con una intensidad de 2000 Lux., el pH presento un valor promedio de 7,23 y agitación a través de la inyección de aire por medio de bombas de inyección.
- Se realizó monitoreo y seguimiento constante a fin asegurar características óptimas de crecimiento y adaptabilidad, dando condiciones de luminosidad, agitación y temperatura para asegurar un cultivo homogéneo.

Control y recuento en la cámara de Neubauer

Los controles se realizaron de manera periódica para monitorear algún tipo de contaminación del cultivo, no habiéndose registrado contaminación debido a la inocuidad del cultivo madre; El recuento se desarrolló en el laboratorio de aguas de la Universidad Nacional Autónoma de Chota, el procedimiento realizado fue el siguiente:

Tripsinización: desprendimiento de las células que crecen en el cultivo, uso de tripsina para la separación de las células de forma individual.

Adición de solución de azul tripán: para visualizar y diferenciar las células vivas y células muertas (coloide que se introduce en el interior de las células que presentan roturas en la membrana).

Conteo en cámara de Neubauer de dos rejillas, profundidad 0,100 mm y área de cuadrante 0,0025mm².

Monitoreo de crecimiento

El procedimiento consistió en realizar muestreos al azar de cultivos de *Chlorella sp* a fin de determinar su densidad de crecimiento e inocuidad del cultivo, no identificándose contaminación del cultivo o algún factor que haya influido en su crecimiento.

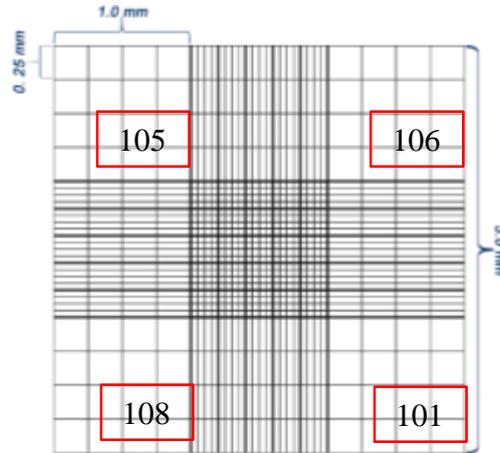
Densidad poblacional en cultivo de adición - cámara de Neubauer

Se utilizó cultivo de adición o cultivo madre como aplicación de tratamiento, la densidad poblacional fue de 2,1x10⁶ cel mL⁻¹ los mismos que fueron aplicados a razón de 100 mL, 200 mL y 300 mL en cada sistema de tratamiento.

Adición de 10 µL de suspensión celular en cada rejilla de la cámara y posterior conteo celular en los 4 cuadrantes extremos de las rejillas.

Figura 7

Cámara de Neubauer - conteo en cuadrantes extremos



$$\begin{aligned} &= \frac{N \text{ células}}{\# \text{ cuadros grandes}} \times \frac{1 \text{ cuadro}}{L \times A \times P \text{ mm}^3} \times \frac{1000 \text{ mm}^3}{1 \text{ cm}^3} \times \frac{1 \text{ cm}^3}{1 \text{ mL}} \times \text{FD} \\ &= \frac{420 \text{ células}}{4 \text{ cuadros grandes}} \times \frac{1 \text{ cuadro}}{1 \times 1 \times 0.1 \text{ mm}^3} \times \frac{1000 \text{ mm}^3}{1 \text{ cm}^3} \times \frac{1 \text{ cm}^3}{1 \text{ mL}} \times 2 \\ &= 2100000 \frac{\text{células}}{\text{mL}} \\ &= 2.1 \times 10^6 \text{ cel mL}^{-1} \end{aligned}$$

Densidad de *Chlorella sp* en el tratamiento T_{100R1}, T_{100R2} y T_{100R3}

En el sistema de tratamiento con la adición de 100 mL de *Chlorella sp*, manteniéndose bajo monitoreo periódico, se evidenció un crecimiento exponencial de *Chlorella sp*, encontrándose en un promedio de densidad celular de $2,9 \times 10^6 \text{ cel mL}^{-1}$, registrándose picos de crecimiento los mismos que son controlados por la cinética de crecimiento propio de la misma especie. Para Santos, et al. (2014) mencionan que *Chlorella sp* se diferencia por tener crecimiento rápido, las células se duplican en uno a diez días, alto contenido de lípidos.

Densidad de *Chlorella sp* en el tratamiento T_{200R1}, T_{200R2} y T_{200R3}

En el sistema de tratamiento con la adición de 200 mL de *Chlorella sp*, manteniéndose bajo monitoreo periódico, se evidenció un crecimiento exponencial de *Chlorella sp*, encontrándose en un promedio de densidad celular de $3,4 \times 10^6 \text{ cel mL}^{-1}$,

registrándose picos de crecimiento los mismos que son controlados por la cinética de crecimiento propio de la misma especie.

Densidad de *Chlorella sp* en el tratamiento T_{300R1}, T_{300R2} y T_{300R3}

En el sistema de tratamiento con la adición de 300 mL de *Chlorella sp*, manteniéndose bajo monitoreo periódico, se evidenció un crecimiento exponencial de *Chlorella sp*, encontrándose en un promedio de densidad celular de $4,2 \times 10^6$ cel mL⁻¹, registrándose picos de crecimiento los mismos que son controlados por la cinética de crecimiento propio de la misma especie.

Monitorear la densidad poblacional de *Chlorella sp* nos permite conocer la cantidad de células presentes en cada sistema de tratamiento para poder relacionar su influencia en el contaminante y la aplicación del tratamiento a diferentes densidades, por lo tanto, es un indicador que fue monitoreado constantemente en la cámara de Neubauer.

Etapa 2: Pesaje de acetaminofén

El peso de 4 mg de acetaminofén se realizó con la ayuda de una balanza analítica de alta precisión, el procedimiento consistió en prender la balanza, verificar el nivel, ubicación de los sobres para pesaje, verificación de precisión, tareo con sobres para pesaje, pesaje de acetaminofén hasta alcanzar la precisión de 2 mg y almacenamiento temporal hasta su aplicación en el experimento, para el desarrollo de esta actividad se hizo uso de implementos de seguridad de laboratorio.

Etapa 3: Puesta en marcha del experimento, monitoreo de parámetro de campo y análisis cuantitativos

- La instalación del experimento se realizó en la Av. La Cantuta S/N – Cajamarca en un área firme y estable, en donde se ubicaron los fotobiorreactores debidamente identificados, se tomó en consideración la ubicación del sistema eléctrico necesario para el funcionamiento de la bomba de aire.
- Los cultivos de *Chlorella sp* fueron inoculados en cada uno de los fotobiorreactores de material plástico y transparente en forma de probeta graduada, aforados a un volumen de 1 L con una matriz de agua residual extraída de la planta de tratamiento

de aguas residuales de la ciudad de Celendín que previamente fue tratada con filtración al vacío con filtros Milipore con un tamaño de poro de 0,54 μm para eliminar impurezas orgánicas e inorgánicas, y la presencia de algas, virus o bacterias que puedan influir en la remoción de acetaminofén.

- El sistema de tratamiento consistió en la instalación de seis fotobiorreactores de control negativo y control positivo y nueve fotobiorreactores de tratamiento a diferente densidad poblacional de *Chlorella sp.* 100 mL, 200 mL y 300 mL de biomasa fresca algal con una densidad de células de $2,1 \times 10^6$ cel mL⁻¹.
- Se adicionó de 5 mL de F/2 Guillard's Algae Food – Part A y 5 mL de F/2 Guillard's Algae Food – Part B, como parte del requerimiento nutricional de *Chlorella sp.*
- Cada fotobiorreactor contó con un sistema de aireación, que sirvió como fuente de oxígeno y homogenización del agua residual (agitación), a fin de evitar la precipitación de *Chlorella sp* (Salgueiro, 2018).
- Fotoperiodo de 12:12 horas, como factor importante en la regulación de la producción y división celular, el sistema estuvo expuesto a luz directa generada por fluorescentes de luz blanca de 36 Wattss (Bhola et al., 2011) con una intensidad de 2000 Lux.
- El sistema de tratamiento se mantuvo con una temperatura promedio de 21,20 °C constante durante el tiempo de ejecución de la investigación.
- El pH mantuvo un valor promedio de 7,23 manteniéndose con ligeras variaciones.
- El tiempo de retención hidráulica (TRH) para cada fotobiorreactor fue de 5 días.
- Adición de 4 mgL⁻¹ de acetaminofén como elemento de estudio (contaminante).
- Puesta en marcha del experimento.

Monitoreo de parámetros de campo

El monitoreo de los parámetros de campo se realizó directamente en el sistema de fotobiorreactores, conforme al cronograma de actividades; los parámetros de oxígeno disuelto, temperatura y pH realizaron diariamente, estos parámetros influyen y son justificativos en la remoción de acetaminofén; las muestras fueron enviadas al Laboratorio Regional del Agua – GORECAJ realizando los siguientes procedimientos.

- Oxígeno disuelto (OD): este parámetro fue monitoreado con un multiparámetro y contrastado con él envió de muestras al Laboratorio Regional del Agua – GORECAJ para asegurar la certeza de los resultados; para el envío a laboratorio se recolectó la

muestra en un frasco Winkler de 250 mL, se vertió al ras el agua proveniente del sistema de fotobiorreactores, se procedió a tapar y eliminar lo sobrante; se abrió el frasco y agregó los preservantes (Rx1: Sulfato manganoso y Rx2: Hidróxido de sodio, azida de sodio y yoduro de potasio); se volvió a tapar, eliminación del sobrante y movimientos invertidos para homogenizar la muestra con los preservantes. El método de detección utilizado en laboratorio fue: SMEWW-APHA-AWWA-WEF Part 4500-O C, 23rd Ed. 2017. Oxygen (Dissolved). Azide Modification.

- pH: este parámetro fue monitoreado con un multiparámetro y contrastado con el envío de muestras LRA – GORECAJ para asegurar la certeza de los resultados; para el envío a laboratorio se recolectó la muestra en un frasco de plástico de 250 mL, se vertió 200 mL de agua proveniente del sistema de fotobiorreactores la muestra no requiere la adición de preservante. El método de detección utilizado en laboratorio fue: SMEWW-APHA-AWWA-WEF Part 4500-H+ B, 23rd Ed. 2017. pH Value. Electrometric Method.
- Temperatura: este parámetro fue monitoreado con un multiparámetro debidamente calibrado en cada uno de los fotobiorreactores.
- Tiempo de retención hidráulica; según bases teóricas se estableció de 5 días, conforme a lo justificado por CENTA (2008) y Gaibor (2005).

Recolección de las muestras

Se realizó conforme al procedimiento de toma de muestras establecido por el Dr. León Villegas jefe del laboratorio de bioquímica – UPCH; recolección a través de toma de muestras simples por recolección manual, rotulado e identificación de las muestras; la recolección de muestras estuvo determinado por el método y validación de ensayo de HPLC en laboratorio y en cumplimiento al cronograma, establecido en los puntos de monitoreo especificados.

Preparación de las muestras

De cada fotobiorreactor del sistema de control positivo, control negativo tratamiento y repeticiones se realizó el siguiente procedimiento:

- Toma de muestras de 15 mL en tubo de propileno, base cónica, tapa rosca.
- Centrifugado a 1500 rpm por un tiempo de 10 min.

- Toma de alícuota de 4 mL.
- Filtración con SIMPLEPURE PES 0,54 µm.
- Adición de 1 mL de metanol, que actúa como inhibidor de la actividad biológica.
- Homogenización de la muestra.

Conservación y envío de las muestras.

La conservación de muestras se realizó en un cooler térmico conteniendo las muestras refrigeradas con ice pack a una temperatura de 4 °C; las muestras no requirieron la adición de algún preservante, se envió por transporte terrestre inmediatamente de haber conservado las muestras, el cooler se mantuvo cerrado desde la toma de muestras hasta su ingreso al laboratorio de bioquímica - UPCH.

Análisis cuantitativo por HPLC y condiciones cromatográficas.

El análisis cuantitativo se realizó en el laboratorio de bioquímica de la Universidad Peruana Cayetano Heredia con la determinación y validación del método analítico de cromatografía líquida de alta resolución (HPLC).

Se usó metodología por HPLC descrita por Nief Rahman Ahmad and Farha Khalaf Omar (1, 4). Para el análisis se inyectaron 20 µL de las soluciones del eluato (muestra) y estándar a través de un inyector automático en un sistema HPLC-DAD modelo 1260 (Agilent, USA). La separación se realizó en una columna Zorbax SB 5 µm, 150 x 4.6 mm. La fase móvil consistió en una mezcla de Metanol: Agua (30:70, v/v). La temperatura del horno de la columna estuvo a 25 °C y el flujo fue de 1,0 mL/min. La detección del acetaminofén se realizó a 254 nanómetros (nm).

Las curvas de calibración fueron hechas por la medición de las áreas de picos, a partir de ello se calculó las concentraciones de acetaminofén en cada una de las muestras.

$$C \left(\frac{\mu g}{mL} \text{ o } \frac{mg}{L} \right) = \frac{Am}{Ast} \times Cst \times Fd \times p \dots\dots\dots N^{\circ} 1$$

Donde:

C = concentración de la muestra

Am: área de la muestra

Ast: área del estándar

Cst: concentración del estándar

Fd: inversa del factor de dilución

p: potencia

Linealidad del método

Se usó metodología original descrita por Nief Rahman Ahmad and Farha Khalaf Omar (1), se alteró las concentraciones de las diluciones a comodidad. A partir de la solución madre de 40 mg de paracetamol en 100 mL de metanol se realizaron diluciones teóricas con fase móvil a 16 ug/mL, 8 ug/mL, 4 ug/mL, 2 ug/mL, 1 ug/mL y 0.5 ug/mL, y almacenadas a 4 °C. Se hizo 2 mezclas (n=2), y 2 inyecciones (réplicas) de 20 µL de las mezclas de las soluciones estándares de acetaminofén al sistema HPLC-DAD.

Test de regresión lineal simple

Se realizó el test de regresión lineal simple para explicar la relación entre la respuesta (eje y) y una variable explicativa (eje x), mediante la siguiente fórmula descrita en el libro de sistema de análisis estadístico de Pedroza y Discovskyi (2).

$$y = \alpha \pm \beta X \dots \dots \dots N^{\circ} 2$$

Donde:

γ : respuesta

α : Intercepto

β : pendiente de la recta

X: variable explicativa

Coefficiente de correlación lineal y coeficiente de determinación

Para medir la dependencia lineal que existe entre la respuesta y la variable explicativa, se usó la siguiente fórmula descrita en el libro de sistema de análisis estadístico de Pedroza y Discovskyi (2).

$$r = \frac{S_{xy}}{S_x S_y} \dots\dots\dots \text{N}^\circ 3$$

Donde:

r: coeficiente de correlación muestral

S_{xy}: es la covarianza muestral entre el eje x y eje y

S_x: covarianza muestral del eje x

S_y: Covarianza muestral del eje y

El coeficiente de determinación (R²) es el cuadrado del coeficiente de correlación muestral (2).

Se realizó una curva de calibración con 6 niveles de concentración teóricos a 0,51 ug mL⁻¹, 1,02 ug mL⁻¹, 2,04 ug mL⁻¹, 4,08 ug mL⁻¹, 8,16 ug mL⁻¹ y 16,32 ug mL⁻¹ a partir de la solución madre de 400 ug/mL de acetaminofén.

Tabla 4

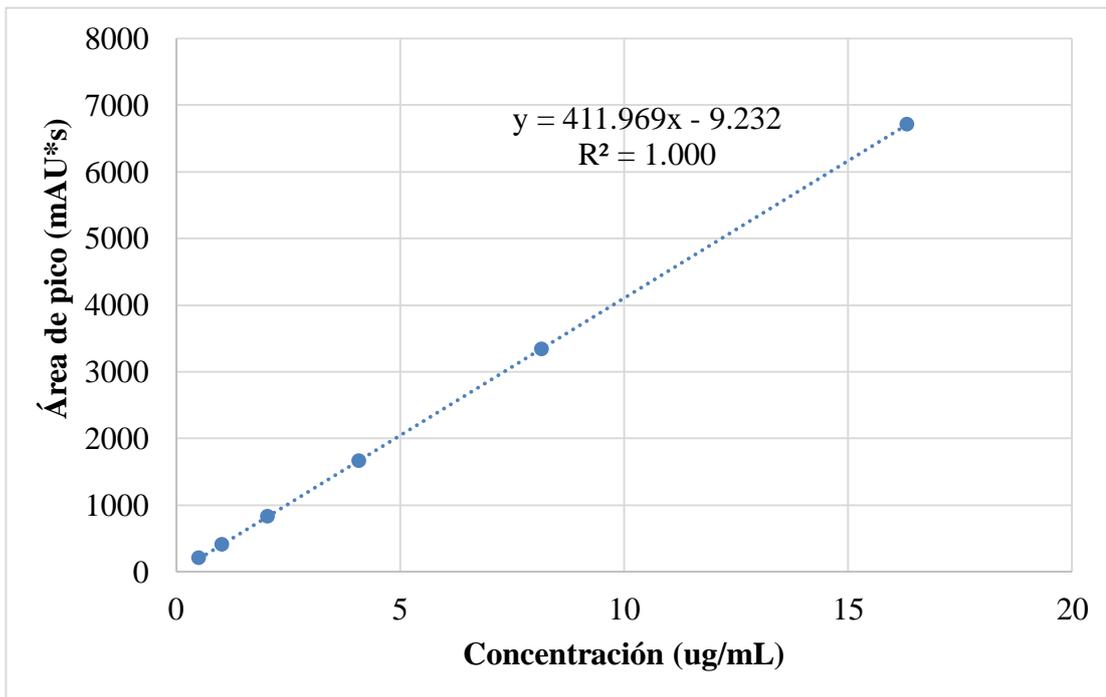
Diluciones del estándar de acetaminofén a partir de la solución madre y el promedio de las áreas de picos obtenidos.

En la figura 8 se observa la curva de calibración obtenida en función del promedio de las áreas cromatográficas frente a la concentración del estándar de acetaminofén, los resultados del promedio de las 6 inyecciones (n=2, 3 inyecciones para cada mezcla) se muestran en la tabla 4. La curva de calibración para el paracetamol corresponde a una línea recta cuya ecuación es $y = 411,969x - 9,232$ con un $R^2 = 1,00$, ello indica que existe una relación lineal entre el área y su concentración; el cromatograma obtenido para el estándar de paracetamol cuyo tiempo de retención fue de 2,5 minutos en las condiciones ensayadas.

Acetaminofén (ug/mL)	Área pico cromatográfico (mAU*s)				Promedio	Desviación estándar
	M1A	M1B	M2A	M2B		
0,51	206,59	206,73	206,99	207,03	206,84	0,21
1,02	412,63	412,38	412,96	412,99	412,74	0,29
2,04	832,03	832,27	833,02	833,13	832,61	0,54
4,08	1664,04	1664,59	1663,22	1665,19	1664,26	0,84
8,16	3345,20	3346,42	3346,51	3346,21	3346,09	0,60
16,32	6718,61	6718,68	6717,37	6719,91	6718,64	1,04

Figura 8

Curva de calibración para el estándar de acetaminofén.



Análisis de estabilidad

La estabilidad se evaluó a temperatura ambiente del estándar de acetaminofén a 4 ug/mL durante las 24 y 48 horas. Se hizo una mezcla y se realizó 3 inyecciones, siguiendo con el método desarrollado.

Se hizo la mezcla de la solución de estándar de acetaminofén y se obtuvo las concentraciones a partir de la ecuación de la recta (Tabla 4 y Figura 5). Se evaluó la estabilidad a las 24 y 48 horas del estándar a una concentración de 4,1 ug mL⁻¹ para corroborar si existe algún cambio estándar o algún cambio perceptible durante el tiempo que permaneció dentro del sistema HPLC, la concentración del estándar se mantuvo cerca al 100 % (concentración inicial) con una variación mínima, desviación estándar y desviación estándar relativa dentro de los márgenes aceptables, es decir, estos fueron estables.

Tabla 5 Evaluación de la estabilidad de acetaminofén a 4 ug mL⁻¹

Estabilidad tiempo	Área de pico	Concentración (ug mL-1)	Concentración promedio	Concentración (%)	DSR (%)	DS
Inicio	1700,45	4,15				
	1700,46	4,15	4,15	100,00	0,02	0,0009
	1699,79	4,15				
24 Horas	1704,18	4,16				
	1690,02	4,13	4,14	99,83	0,42	0,017
	1697,90	4,14				
48 Horas	1701,61	4,15				
	1691,94	4,13	4,15	99,95	0,39	0,016
	1704,55	4,16				

Evaluación de precisión

Se usó la desviación estándar relativa (DSR) para evaluar la precisión del sistema cromatográfico a las áreas bajo la curva y tiempo de retención (TR), mediante 6 inyecciones a 4 ug/mL de soluciones estándar de acetaminofén, esta debe ser menor del 2 %, según lo mencionado en los trabajos de investigación de Nief Rahman Ahmad and Farha Khalaf Omar (1) y Manousi, N. et al (3).

$$DSR (\%) = \left(\frac{DS}{\bar{x}} \right) \times 100 \dots\dots\dots N^{\circ} 4$$

$$DS = \frac{\sqrt{(x-\bar{x})^2}}{N-2} \dots\dots\dots N^{\circ} 5$$

Donde:

DSR: desviación estándar relativa o coeficiente de variación

DS: desviación estándar

\bar{x} : promedio del área bajo la curva o tiempo de retención

N: número de datos

x: valores obtenidos

Para el estudio de la precisión se realizó 6 inyecciones a una concentración teórica de 4.1 ug mL⁻¹ de la solución estándar de acetaminofén. Los %DSR para las áreas y tiempo de retención son menores al 2 % (Tablas 9), por lo tanto, el método analítico es preciso.

Tabla 6

Precisión del sistema cromatográfico en tiempo de retención y áreas de las señales cromatográficas del estándar de paracetamol a la concentración de 4,08 ug mL⁻¹.

Inyección o réplicas	Tiempo de retención	Áreas de picos
1	2,51	1705,79
2	2,51	1703,97
3	2,51	1701,86
4	2,52	1700,45
5	2,51	1700,46
6	2,51	1699,79
\bar{x}	2,51	1702,05
DS	0,0022	2,37
DSR (%)	0,086	0,14

Determinación del límite de cuantificación y detección

Se determinó a partir de los datos de seis diluciones cuyas concentraciones teóricas fueron 16 ug/mL, 8 ug/mL, 4 ug/mL, 2 ug/mL, 1 ug/mL y 0.5 ug/mL, para ello se preparó 2 muestras y se inyectó por duplicado cada dilución. Se aplicó la ecuación obtenida en la regresión lineal para obtener las concentraciones experimentales; el límite de cuantificación y detección se calculó mediante las siguientes fórmulas (1, 3 y 4) que se detallan a continuación.

$$LC = \frac{10 \times DS}{\beta} \dots\dots\dots \text{N}^\circ 6$$

$$LD = \frac{3 \times DS}{\beta} \dots\dots\dots \text{N}^\circ 7$$

$$DS = \sqrt{S^2_{xy}} \dots\dots\dots N^\circ 8$$

$$S^2_{xy} = \frac{\sum y^2 - \alpha \sum y - \beta \cdot \sum xy}{n - 2} \dots\dots\dots N^\circ 9$$

Donde:

LC: límite de cuantificación

LD: límite de detección

DS: desviación estándar

β : pendiente de la curva de calibración

α : intercepto

S² xy : Varianza

Se aplicó la ecuación de la recta y se determinó las concentraciones experimentales de las seis diluciones de 0,51 ug mL⁻¹, 1,02 ug mL⁻¹, 2,04 ug mL⁻¹, 4,08 ug mL⁻¹, 8,16 ug mL⁻¹ y 16,32 ug mL⁻¹. Los datos empleados en los cálculos se muestran en la Tabla 07 y los resultados del límite de detección y límite de cuantificación que fue 0,044 ug mL⁻¹ y 0,146ug mL⁻¹ se muestran en la Tabla 08.

Tabla 7*Datos para calcular los límites de detección y de cuantificación de acetaminofén.*

n=24	x	y	x.y	y ²	y/x	Varianza
1	0,51	206,59	105,36	42680,94	405,09	
2	0,51	206,73	105,43	42737,13	405,35	0,11
3	0,51	206,99	105,57	42848,63	405,88	
4	0,51	207,03	105,59	42860,78	405,94	
1	1,02	412,63	420,88	170259,32	404,53	0,53
2	1,02	412,38	420,62	170052,99	404,29	
3	1,02	412,96	421,22	170538,65	404,87	
4	1,02	412,99	421,25	170557,11	404,89	1,98
1	2,04	832,03	1697,35	692279,76	407,86	
2	2,04	832,27	1697,83	692671,16	407,98	
3	2,04	833,02	1699,35	693917,07	408,34	0,04
4	2,04	833,13	1699,59	694110,38	408,39	
1	4,08	1664,04	6789,28	2769023,96	407,85	
2	4,08	1664,59	6791,52	2770855,71	407,99	0,02
3	4,08	1663,22	6785,94	2766304,73	407,65	
4	4,08	1665,19	6794,00	2772878,29	408,14	
1	8,16	3345,20	27296,87	11190390,47	409,95	0,79
2	8,16	3346,42	27306,77	11198508,34	410,10	
3	8,16	3346,51	27307,53	11199132,53	410,11	
4	8,16	3346,21	27305,08	11197127,65	410,08	0,56
1	16,32	6718,61	109647,75	45139751,24	411,68	
2	16,32	6718,68	109648,82	45140630,44	411,68	
3	16,32	6717,38	109627,47	45123054,75	411,60	0,004
4	16,32	6719,91	109668,98	45157231,94	411,76	
Suma	128,52	52724,71	583870,05	240050403,95	9792,00	4,03

α : -9,232 DS : 6,031
 β : 411,969 LD : 0,04391835
V : 36,3685513 LC : 0,14639451

Tabla 8*Límites de cuantificación y detección del acetaminofén.*

Compuesto	LD (ug mL ⁻¹)	LC (ug mL ⁻¹)
Acetaminofén	0,044	0,146

Análisis de recuperación

Se usó metodología descrita por Nief Rahman Ahmad and Farha Khalaf Omar (1) y se usó la fórmula planteada por Manousi, N. et al y Nief Rahman Ahmad (3,4). Se adicionó una concentración conocida de 4 ug/mL de acetaminofén a una muestra de agua residual basal o blanco, y se procedió de acuerdo con el procedimiento descrito en la sección de análisis cuantitativo. Se hizo dos mezclas de los estándares y 3 inyecciones a cada muestra.

$$\% \text{ de recuperación} = \frac{c_e}{c_d} \times 100 \dots\dots\dots \text{N}^\circ 10$$

Donde:

Ce: Concentración encontrada

Cd: Concentración declarada o conocida

Se enriqueció 2 muestras de agua residual con cantidades conocidas de 4,128 ug mL⁻¹ de acetaminofén, se hizo tres inyecciones a cada mezcla.

Se obtuvo las concentraciones a través de la ecuación N°2, considerando la pureza del acetaminofén de 99,9%.

La recuperación obtenida fue 99,62 % ± 0,0043 y la desviación estándar de relativa (DSR) fue de 0,11 %, como se muestra en la Tabla 9, las cuales están dentro del rango de 98 -102 % que valida la exactitud del método.

Tabla 9

Datos usados para calcular el porcentaje de recuperación de acetaminofén en agua residual enriquecida, n=2, tres inyecciones

Muestra	Área de pico	Concentración encontrada (ug mL ⁻¹)	Concentración promedio	Recuperación (%)	DRS (%)	DS
SPIKED	1685,79	4,114				
Muestra	1683,97	4,110				
1	1681,86	4,105	4,11	99,62	0,11	0,0043
	1684,96	4,112				
SPIKED	1685,59	4,114				
Muestra2	1686,96	4,117				

Tabla 10

Recuperación de acetaminofén en agua residual enriquecida, n=2, tres inyecciones.

Compuesto	Concentración declarada(ug/mL)	Concentración encontrada (ug/mL)	Recuperación (% media ± DS)	DSR (%)
Acetaminofén	4,13	4,11	99,62 ± 0,0043	0,11

Frecuencia de monitoreo

El monitoreo de acetaminofén se realizó con una frecuencia de una vez cada cinco días; los parámetros oxígeno disuelto, temperatura, pH y tiempo de retención hidráulica se realizaron todos los días en cada fotobiorreactor, se realizaron en los puntos de monitoreo según el cronograma establecido; lo que permitió observar los cambios principales que ocurrieron durante el monitoreo.

Tabla 11

Frecuencia de los parámetros monitoreados

Parámetro	Frecuencia	TC ₀	TC _{5D}	T ₁₀₀	T ₂₀₀	T ₃₀₀
Concentración de acetaminofén	c/ 5 días	X	X	X	X	X
OD	Cada día	X	X	X	X	X
pH	Cada día	X	X	X	X	X
T°	Cada día	X	X	X	X	X
TRH	Cada día	X	X	X	X	X

c) Fase de gabinete

En la fase de gabinete se realizó la sistematización de resultados, además de someterlo a pruebas estadísticas, se realizó el análisis por tratamiento a fin de evaluar la eficiencia de la densidad poblacional de *Chlorella sp* en los diferentes tratamientos y repeticiones con la adición de 4 mgL⁻¹ de acetaminofén como contaminante; el tratamiento T_{100R1}, T_{100R2} y T_{100R3} a una concentración de 100 mL de biomasa fresca algal, el tratamiento T_{200R1}, T_{200R2} y T_{200R3} a una concentración de 200 mL de biomasa fresca algal y el tratamiento T_{300R1}, T_{300R2} y T_{300R3} a una concentración de 300 mL de *Chlorella sp*.

El cálculo del porcentaje de remoción de acetaminofén se calculó bajo el sucesivo procedimiento de cálculo:

- Se realizó el cálculo de datos promedios de acetaminofén; para cada punto de monitoreo en cada fotobiorreactor de control y tratamiento con microalga *Chlorella sp.* Aplicando la siguiente fórmula.

$$\bar{X} = \frac{\sum x}{n}$$

Dónde:

\bar{X} = promedio aritmético

X = valor individual de cada dato

n = número de datos

- Con los promedios obtenidos en cada fotobiorreactor de tratamiento se realizó el cálculo del porcentaje de remoción de acetaminofén con el uso de la siguiente fórmula.

$$\% \text{ de remoción} = \frac{\text{Cc inicial acetaminofén} - \text{Cc final acetaminofén}}{\text{Cc inicial acetaminofén}} * 100$$

Dónde:

Remoción: Eficiencia de remoción de acetaminofén (%)

Cc inicial acetaminofén: Concentración inicial de acetaminofén, 4 mgL⁻¹ en cada fotobiorreactor.

Cc final acetaminofén: Concentración final de acetaminofén, después de haberse aplicado el tratamiento con *Chlorella sp.*

3.3.1. Técnicas e instrumentos de recopilación de información

Durante el desarrollo de la investigación se utilizó las siguientes técnicas e instrumentos de recopilación de datos.

Tabla 12

Técnicas e instrumentos de recopilación de información

Parámetro	Método de detección
Concentración de acetaminofén	Método analítico de determinación cuantitativa - cromatografía líquida de alta resolución (HPLC)
Oxígeno disuelto (OD)	SMEWW-APHA-AWWA-WEF Part 4500-O C, 23rd Ed. 2017. Oxygen (Dissolved). Azide Modification.
Potencial de hidrogeno (pH)	SMEWW-APHA-AWWA-WEF Part 4500-H+ B, 23rd Ed. 2017. pH Value. Electrometric Method.
Temperatura (T°)	Instrumental
Tiempo e retención hidráulica (TRH)	Instrumental

CAPÍTULO IV

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1. Determinación de la concentración de acetaminofén en el efluente de la planta de tratamiento de aguas residuales de Celendín

Tabla 13

Concentraciones de acetaminofén en el efluente de la planta de tratamiento de aguas residuales.

Código muestras	Área de pico cromatográfico			Concentración (mg L ⁻¹)			Promedio (mg L ⁻¹)	Desviación estándar
	1	2	3	1	2	3		
PTAR	10,14	11,09	10,08	0,042	0,042	0,041	0,042	0,001

Se determinó la concentración de acetaminofén en el efluente de la planta de tratamiento de aguas residuales de Celendín, realizándose envíos de muestras al laboratorio de bioquímica de la UPCH, a través de cromatografía líquida de alta resolución se registró áreas de picos cromatográficos de 10,14; 11.09 y 10.08 siendo áreas equivalentes a una concentración promedio de 0,042 mg L⁻¹, su presencia en las aguas residuales según estudios realizados por la ASHP, determina que la excreción renal del acetaminofén es de 85 - 90 %, lo que significa que el N-(4-hidroxifenil) acetamida ingresa a la planta de tratamiento de aguas residuales directamente a través de la red de alcantarillado en su forma química o sus derivados; mucho más, que en los sistemas de tratamiento de aguas residuales, no hay un tratamiento específico para productos químicos especialmente fármacos, que por su composición química de estos fármacos no se encuentran biodisponibles limitando la capacidad biodegradadora de los microorganismos responsables de la depuración de aguas residuales, asumiéndose que en su forma química o sus derivados estas van a parar a los cuerpos hídricos alterando la flora y fauna acuática.

Los productos farmacéuticos, metabolitos y/o productos de degradación debido a su alta polaridad y baja volatilidad, la mayoría de fármacos son más disponibles de ser transportados a la columna de agua (Zhang, et al. 2014).

El acetaminofén una vez administrados, puede excretarse del organismo sin sufrir ninguna transformación, o pueden metabolizarse mediante reacciones de oxidación, reducción, hidrólisis y alquilación, o bien formar conjugados más polares e hidrofílicos que se excretan en la orina o la bilis (Heberer, 2012); los ingredientes o compuestos farmacéuticos activos de los fármacos pueden integrarse en el ambiente por procesos de producción, uso o eliminación, la existencia de estos en los ecosistemas naturales puede perturbar la vida silvestre por la modificación biológica que ejercen o por el efecto de bioacumulación y potencial tóxico en los organismos vivos, convirtiéndose en un problema progresivo para tomarlo en consideración y realizar acciones inmediatas para su mitigación (EMEA 2018); el problema se acentúa más aún que los contaminantes emergentes, entre ellos los fármacos, son productos que tiene características de persistencia en el ambiente.

4.2. Estimación de parámetros fisicoquímicos en los fotobiorreactores de tratamiento

Tabla 14

Valores promedio de monitoreo de parámetros de campo

Tratamiento	Oxígeno disuelto (OD) mgO²L⁻¹	Temperatura °C	pH	Tiempo de retención hidráulica días	Volumen L
TC-00 R1	16,5	19,5	7,14	5	1
TC-00 R2	16,4	19,5	7,18	5	1
TC-00 R3	16,1	21	7,11	5	1
TC+04 R1	17	22,5	7,1	5	1
TC+04 R2	16,6	24	7,12	5	1
TC+04 R3	16,7	24	7,15	5	1
T100R1	16,4	23	7,19	5	1
T100R2	16,7	21	7,12	5	1
T100R3	16,9	20	7,1	5	1
T200R1	16,3	19	7,18	5	1
T200R2	16,8	18	7,5	5	1
T200R3	16,4	19	7	5	1
T300R1	16,9	23	7,4	5	1
T300R2	16,5	22	7,7	5	1
T300R3	16,8	22,5	7,5	5	1
Promedio	16,6	21,20	7,23	5	1

Todos los parámetros de campo fueron monitoreados directamente en el sistema de fotobiorreactores con la ayuda de equipos debidamente calibrados y contrastados con envíos de muestras al laboratorio regional del agua del gobierno regional de Cajamarca (acreditado por INACAL), para confirmar la precisión de los resultados.

El oxígeno disuelto monitoreado en el sistema de fotobiorreactores presentó una ligera variación, presentando valores que fluctuaron entre $16,1 \text{ mgO}_2 \text{ L}^{-1}$ y $17 \text{ mgO}_2 \text{ L}^{-1}$, manteniendo un promedio de $16,6 \text{ mgO}_2 \text{ L}^{-1}$, el elevado valor de la concentración de oxígeno disuelto es atribuido a la inyección de aire u oxigenación del agua, con la finalidad de homogenizar el contaminante y mantener en movimiento la masa de agua a fin de evitar la sedimentación de *Chlorella sp*; el monitoreo de este parámetro se realizó de manera directa en cada fotobiorreactor con el uso de un multiparámetro debidamente calibrado, con fines de contrastación se enviaron muestras de control al laboratorio regional del agua (laboratorio acreditado por INACAL); el monitoreo del oxígeno disuelto nos permite monitorear la cinética de crecimiento de *Chlorella sp*, y los valores de aireación alcanzados con las bombas de aire; el oxígeno disuelto es la cantidad de oxígeno gaseoso disuelto en el agua, varía inversamente proporcional a la temperatura, la solubilidad del oxígeno depende de la temperatura, la presión atmosférica y la salinidad (López, et al. 2015), en la investigación el oxígeno disuelto determinó las reacciones biológicas de *Chlorella sp* al ser un organismo biológico y realizar funciones fotosintéticas, por lo tanto es una variable que influye en el objetivo de la investigación.

La temperatura se mantuvo en un rango ligeramente variable, presentando valores que fluctuaron entre 18°C y 24°C se mantuvo en un promedio de $21,20^\circ\text{C}$, coincidiendo con la temperatura ambiental de la ciudad de Cajamarca durante los meses monitoreados, según la bibliografía consultada el rango de temperatura óptimo para el crecimiento de la mayoría de las microalgas está entre 18 y 25°C . Por lo tanto, podemos afirmar que el sistema de tratamiento estuvo en condiciones de temperatura óptima, debido a la importancia de este parámetro que interfiere en el metabolismo, requerimientos de nutrientes y la composición de la biomasa, dentro de límites aceptables, tienen poco efecto sobre la concentración final de biomasa, la producción de microalgas y la composición bioquímica, en estos organismos existe una relación entre la temperatura y la actividad biológica, la tasa de crecimiento aumenta con el aumento de la temperatura dentro de un rango aceptable, y si la temperatura continúa aumentando, la tasa de crecimiento se ralentiza, a veces dramáticamente a cero.

El pH del sistema de fotobiorreactores presento una ligera variación, presentando valores que fluctuaron entre 7 y 7,7 unidades de pH, manteniendo un promedio de 7,23, el mismo que es considerado y pH neutro, el monitoreo de este parámetro se realizó de manera directa en cada fotobiorreactor con el uso de un multiparámetro debidamente calibrado, con fines de contrastación se enviaron muestras de control al laboratorio regional del agua para la fiabilidad de los resultados; la bibliografía consultada menciona que las microalgas requieren de un pH óptimo para su cultivo (entre 7 y 8), un descenso de pH suele ser letal, en cambio suelen soportar mejor los incrementos del pH, hasta un cierto límite, además de que el pH influye directa e indirectamente en el metabolismo de las microalgas (Muñoz, 2016).

Como factor determinante en la regulación de la producción y división celular, el sistema estuvo expuesto a luz directa generada por fluorescentes de luz blanca de 36 Wattss (Bhola et al., 2011) con una intensidad de 2000 Lux y con un fotoperiodo de 12:12 horas, controlado a través de un timer digital, por lo que el sistema de tratamiento se mantuvo controlado bajo condiciones de luz y fotoperiodo controlados.

La inyección de aire se realizó de manera continua a todo el sistema de fotobiorreactores del tratamiento con un caudal de 10 Lmin⁻¹, con la finalidad de suministrar oxígeno al sistema de tratamiento y mantener en constante movimiento al agua, asegurando una distribución homogénea de *Chlorella sp*, los nutrientes y la concentración de acetaminofén; mejoró la distribución de la luz en las células de *Chlorella sp* para que estas se mantengas fotosintéticamente activas evitando el efecto de ensombrecimiento o zonas afóticas; con la inyección de aire se evitó la sedimentación en el fondo de cada fotobiorreactor por efecto de la gravedad; la aireación contribuyó con los gradientes gaseosos que se forman alrededor de *Chlorella sp* determinando su actividad metabólica, que debido a la actividad fotosintética incremento considerablemente la concentración de oxígeno disuelto.

4.3. Remoción del acetaminofén en el sistema de fotobiorreactores de tratamiento

La concentración de acetaminofén en cada tratamiento y repetición con densidad poblacional de 100 mL, 200 mL y 300 mL fue calculada en función al área de cada pico formado.

Se realizó el análisis de las muestras con tres tratamientos por triplicado, así como evaluación de la muestra a tiempo Cero y luego de 5 días de tratamiento como control. Los resultados se muestran en la tabla 14.

Tabla 15

*Concentraciones de acetaminofén en muestras de agua residual post tratamiento con *Chorella sp.**

Código muestras	Área de pico cromatográfico			Concentración (mg L ⁻¹)			Promedio (mg L ⁻¹)	Desviación estándar	Chorella sp. (mL)
	1	2	3	1	2	3			
T₀	1313,77	1305,34	1312,52	4,01	3,99	4,01	4,00	0,01	0
T_{5D}	1228,19	1224,3	1230,89	3,76	3,74	3,76	3,75	0,09	0
T_{100R1}	241,71	241,81	241,21	0,76	0,76	0,76	0,76	0,0009	100
T_{100R2}	228,83	227,66	228,96	0,72	0,72	0,72	0,72	0,002	100
T_{100R3}	205,37	205,05	205,42	0,65	0,65	0,65	0,65	0,0006	100
T_{200R1}	32,19	32,06	33,98	0,13	0,16	0,13	0,13	0,003	200
T_{200R2}	123,88	124,13	125,13	0,40	0,41	0,41	0,41	0,002	200
T_{200R3}	86,44	86,23	83,36	0,29	0,29	0,28	0,29	0,004	200
T_{300R1}	29,99	8,57	16,39	0,12	0,05	0,08	0,08	0,02	300
T_{300R2}	24,67	21,36	22,33	0,10	0,09	0,09	0,09	0,002	300
T_{300R3}	16,68	14,99	15,26	0,08	0,07	0,07	0,08	0,001	300

En el tratamiento de control T₀ y T_{5D}, que consistió en la adición de agua residual + 4 mg de acetaminofén con la finalidad de evaluar la degradación del mismo bajo condiciones de instalación y funcionamiento del experimento o su degradación de manera natural; los resultados mostraron la persistencia de acetaminofén en el control del experimento, las concentraciones fueron las mismas, evaluadas a 0 días y a 5 días, realizándose paralelamente conforme a la frecuencia de monitoreo de acetaminofén, presentando las mismas condiciones de persistencia.

En los tratamientos T₁₀₀, T₂₀₀ y T₃₀₀ con la adición de 100 mL, 200 mL y 300 mL respectivamente, mostraron una reducción considerable respecto a la adición de 4mgL⁻¹ de acetaminofén, coincidiendo con Escapa et al. (2017) la eliminación de acetaminofén bajo un sistema experimental en estado estacionario del proceso semicontinuo mostró eficiencias superiores al 69% de paracetamol, del mismo modo, Wilt et al. (2016), en su investigación concluyo que la eliminación fue debido a procesos de adsorción mediante cultivos de *Chlorella sp* siendo mayor al 20% para fármacos como el paracetamol.

4.4. Efecto de la densidad poblacional de *Chlorella sp* en la remoción de acetaminofén

En los tratamientos T₁₀₀, T₂₀₀ y T₃₀₀ se aplicó cultivo madre de *Chlorella sp* como aplicación de tratamiento, la densidad poblacional fue de 2,1x10⁶ cel mL⁻¹ los mismos que fueron aplicados a razón de 100 mL, 200 mL y 300 mL en cada sistema de tratamiento; en el sistema de tratamiento con la adición de 100 mL de *Chlorella sp*, manteniéndose bajo monitoreo periódico, se evidenció un crecimiento exponencial de *Chlorella sp*, encontrándose en un promedio de densidad celular de 2,9x10⁶ cel mL⁻¹, en el sistema de tratamiento con la adición de 200 mL de *Chlorella sp*, se obtuvo un promedio de densidad celular de 3,4x10⁶ cel mL⁻¹ y en el tratamiento con la adición de 300 mL de *Chlorella sp*, manteniéndose bajo monitoreo periódico, se evidenció un crecimiento exponencial de *Chlorella sp*, encontrándose en un promedio de densidad celular de 4,2x10⁶ cel mL⁻¹, registrándose picos de crecimiento los mismos que son controlados por la cinética de crecimiento propio de la misma especie.

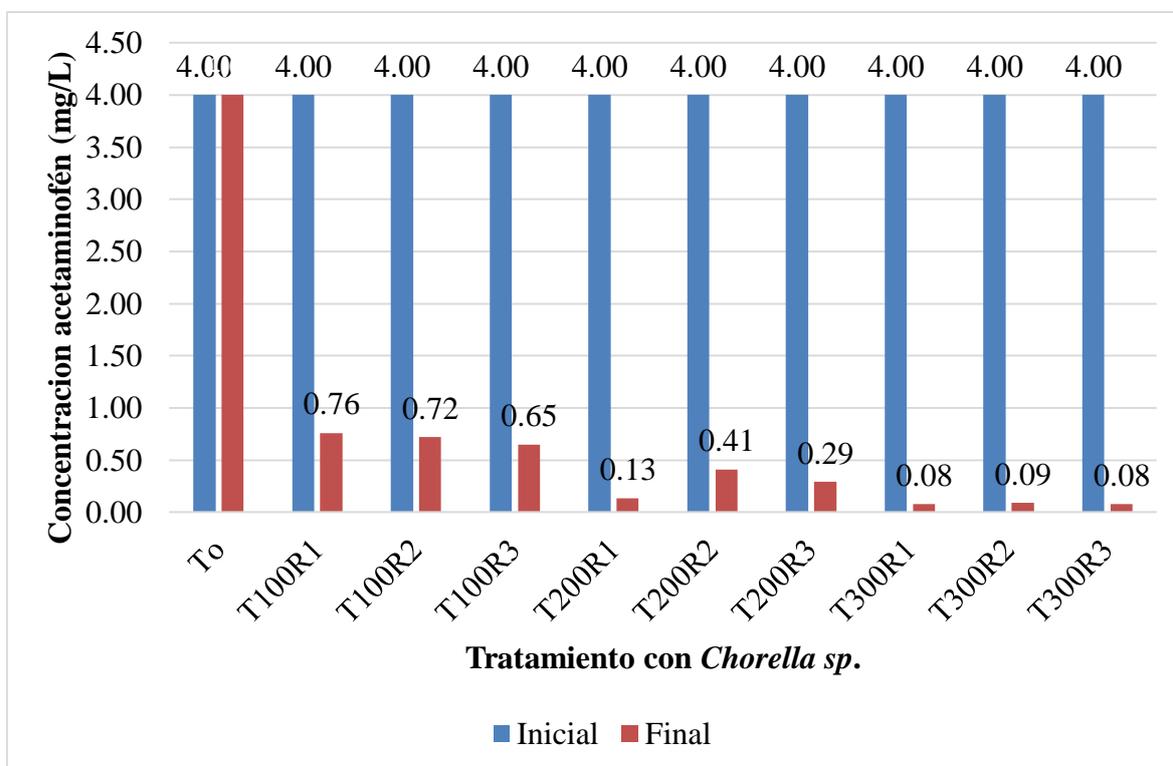
Tabla 16

Corrección con desviación estándar inicial y corrección con desviación estándar a 5 días.

Código muestra	Concentración promedio ± DS inicial (mg L⁻¹)	Concentración promedio ± DS 5 días (mg L⁻¹)
T₀	4,00 ± 0.01	3,75 ± 0,0099
T_{100R1}	4,00 ± 0.01	0,76 ± 0,0009
T_{100R2}	4,00 ± 0.01	0,72 ± 0,0020
T_{100R3}	4,00 ± 0.01	0.65 ± 0,0006
T_{200R1}	4,00 ± 0.01	0,13 ± 0,0030
T_{200R2}	4,00 ± 0.01	0,41 ± 0,0016
T_{200R3}	4,00 ± 0.01	0.29 ± 0,0044
T_{300R1}	4,00 ± 0.01	0,08 ± 0.0157
T_{300R2}	4,00 ± 0.01	0,09 ± 0,0022
T_{300R3}	4,00 ± 0.01	0,08 ± 0,0010

Figura 9

Concentraciones de los promedios de residuos de acetaminofén en muestras de agua residual tratadas con microalga *Chorella sp.* inicial y luego de 5 días.

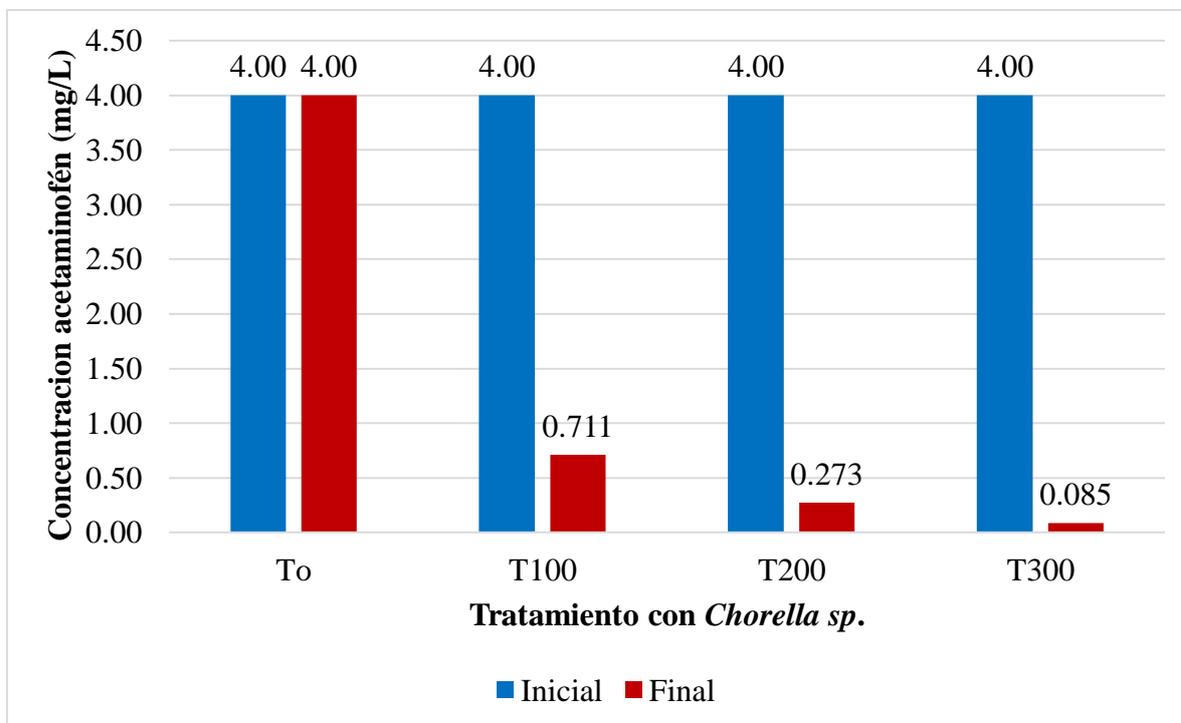
**Tabla 17**

Remoción de acetaminofén en muestras de agua residual tratadas con *Chorella sp.* (100 mL, 200 mL y 300 mL).

Código muestra	<i>Chorella sp.</i> (mL)	Concentración (mg L ⁻¹)	Promedio (mg L ⁻¹)	Desviación estándar	Remoción acetaminofén (%)
To	0	4,00	4,004	0,0113	
T _{5D}	0	3,75	3,753	0,009	
T _{100R1}	100	0,76			
T _{100R2}	100	0,72	0,711	0,056	81,06
T _{100R3}	100	0,65			
T _{200R1}	200	0,13			
T _{200R2}	200	0,41	0,273	0,139	92,72
T _{200R3}	200	0,29			
T _{300R1}	300	0,08			
T _{300R2}	300	0,09	0,085	0,011	97,72
T _{300R3}	300	0,08			

Figura 10

Remoción de acetaminofén a diferentes densidades poblacionales de *Chorella sp.* (100 mL, 200 mL y 300 mL).



En la tabla 17 y figura 10, se presenta los tratamientos de control T₀ y T_{5D}, que contienen agua residual + 4 mg acetaminofén sin la aplicación del tratamiento con la microalga *Chlorella sp.*, se realizaron con la finalidad de evaluar la degradación natural o degradación inducida por algún factor externo de instalación o funcionamiento del experimento; se consideró dos periodos de monitoreo, a tiempo cero y posterior a cinco días; los valores calculados que se muestran evidencian que en el tratamiento T₀ no existe degradación alguna debido a la presencia exacta de 4,00 mg L⁻¹, por otro lado en el tratamiento T_{5D} se evidencia una disminución a 3,75, con una desviación estándar de 0,09, siendo menor a dos por lo tanto no tiene significancia en la investigación por lo tanto es despreciable. Estos controles nos ayudan a confirmar la persistencia del acetaminofén en una matriz de agua residual el mismo que por sus características inorgánicas o los factores externos a los que son expuestos no producen un efecto de degradación; el acetaminofén puede excretarse del organismo sin sufrir ninguna transformación, o pueden metabolizarse mediante reacciones de oxidación, reducción, hidrolisis y alquilación, o bien formar conjugados más polares e hidrofílicos que se excretan en la orina o la bilis (Heberer, 2012).

En la tabla 17 y figura 10, se presenta los valores de T_{100R1} , T_{100R2} y T_{100R3} diseñado bajo el contenido de agua residual + 100 mL de *Chorella sp* + 4 mg acetaminofén, obteniendo concentraciones promedio de $0,76 \text{ mg L}^{-1}$, $0,72 \text{ mg L}^{-1}$ y $0,75 \text{ mg L}^{-1}$ respectivamente calculados a partir del área de los picos cromatográficos por HPLC, se muestra la sistematización de datos calculando un promedio general de 0.711 mgL^{-1} por tratamiento con 100 mL de *Chorella sp*, obteniéndose una remoción de 81,06% con una desviación estándar de 0,056, menor al 2%, lo que nos indica la precisión y fiabilidad de los resultados; la cantidad eliminada o de remoción se expresa como porcentaje respecto a la adición inicial de acetaminofén (4 mg L^{-1}) en el sistema de tratamiento. Este porcentaje de remoción es atribuible a la baja densidad poblacional ($2.9 \times 10^6 \text{ cel mL}^{-1}$) respecto a los otros tratamientos con la adición de 4 mg L^{-1} de acetaminofén como contaminante.

En la tabla 17 y figura 10, se presenta los valores de T_{200R1} , T_{200R2} y T_{200R3} diseñado bajo el contenido de agua residual + 200 mL de *Chorella sp* + 4 mg acetaminofén, obteniendo concentraciones promedio de $0,13 \text{ mg L}^{-1}$, $0,41 \text{ mg L}^{-1}$ y $0,28 \text{ mg L}^{-1}$ respectivamente calculados a partir del área de los picos cromatográficos por HPLC, se muestra la sistematización de datos haciendo un promedio general de $0,273 \text{ mgL}^{-1}$ por tratamiento con 200 mL de *Chorella sp*, calculándose una remoción de 92,72% con una desviación estándar de 0,139, menor al 2%, lo que nos indica la precisión y fiabilidad de los resultados; la cantidad eliminada o de remoción se expresa como porcentaje respecto a la adición inicial de acetaminofén (4 mg L^{-1}) en el sistema de tratamiento.

En la tabla 17 y figura 10, se presenta los valores de T_{300R1} , T_{300R2} y T_{300R3} diseñado bajo el contenido de agua residual + 300 mL de *Chorella sp* + 4 mg acetaminofén, obteniendo concentraciones promedio de $0,08 \text{ mg L}^{-1}$, $0,09 \text{ mg L}^{-1}$ y $0,08 \text{ mg L}^{-1}$ respectivamente calculado a partir del área de los picos cromatográficos por HPLC, en la tabla 16 y figura 20 se muestra la sistematización de datos haciendo un promedio general de $0,085 \text{ mgL}^{-1}$ por tratamiento con 300 mL de *Chorella sp*, calculándose una remoción de 97,72% con una desviación estándar de 0,011, menor al 2%, lo que nos indica la precisión y fiabilidad de los resultados; la cantidad eliminada o de remoción se expresa como porcentaje respecto a la adición inicial de acetaminofén (4 mg L^{-1}) en el sistema de tratamiento. Este porcentaje de remoción es atribuible a la alta densidad poblacional ($4,2 \times 10^6 \text{ cel mL}^{-1}$) respecto a los otros tratamientos con la adición de 4 mg L^{-1} de

acetaminofén como contaminante, donde se obtuvieron porcentajes de remoción más bajos, pero nada despreciables por sobre pasar el 80% de eficiencia de remoción.

Los controles permitieron verificar que la concentración de 4 mg de acetaminofén al estar sometido a iguales condiciones del sistema de tratamiento sin la adición de *Chorella sp*, no mostró ninguna disminución del mismo a lo largo de la ejecución de la investigación, lo que nos puede hacer suponer que en los sistemas de tratamiento la remoción de acetaminofén puede ser asociada a *Chorella sp*; al analizar los datos de la cinética de crecimiento de *Chorella sp* y la remoción de acetaminofén nos lleva a pensar de que existe una relación directamente proporcional definida por mayor densidad poblacional de *Chorella sp* mayor remoción de acetaminofén en una matriz de agua residuales bajo las condiciones en el que se desarrolló la investigación.

Al analizar la eficiencia o el efecto de la densidad poblacional de *Chlorella sp* en la remoción de acetaminofén de una matriz de agua residual, se aplicó los tratamientos con 100 mL, 200 mL y 300 mL de *Chlorella sp* con una densidad inicial de $2,1 \times 10^6$ cel mL⁻¹ para todos los tratamientos, llegando a tener densidades poblacionales de $2,9 \times 10^6$ cel mL⁻¹, $3,4 \times 10^6$ cel mL⁻¹ y $4,2 \times 10^6$ cel mL⁻¹ para los tratamiento T₁₀₀, T₂₀₀ y T₃₀₀ respectivamente durante el tiempo de ejecución y monitoreo del crecimiento e inocuidad de *Chlorella sp*, se logró tener mayor densidad poblacional en el tratamiento T_{300R1}, T_{300R2} y T_{300R3}, a lo que atribuimos que está estrechamente relacionado con el volumen de 300 mL de *Chlorella sp* aplicado en el tratamiento, generando el mayor efecto de remoción de acetaminofén bajo las condiciones de ejecución a las que fueron monitoreadas; Santaefemia et al. (2018) afirman que la biomasa viva genera una alta posibilidad de almacenar grandes cantidades de contaminantes (bioacumulación) o transformarlos en formas menos activas (biotransformación), mejorando el proceso de eliminación.

Al tener una adición constante de 4 mg de acetaminofén en cada sistema de fotobiorreactores, la diferencia radica en el volumen de adición de *Chorella sp* en cada tratamiento, por lo tanto influye directamente en la densidad poblacional de *Chorella sp* respecto al volumen de 1 litro al que fue aforado cada sistema de tratamiento; realizando la comparación de los valores obtenidos como resultado de la aplicación de tratamientos a diferentes densidades poblacionales, las concentraciones promedio de remoción más altos obtenidos corresponden a tratamiento T₃₀₀, más específicamente en los tratamientos T_{300R1} y T_{300R3} que corresponde a la adición de 300 mL de *Chorella sp* siendo el

tratamiento que alcanzó la mayor densidad poblacional de $4,2 \times 10^6$ cel mL⁻¹, esto indica que al haber mayor densidad poblacional de *Chorella sp* hay mayor probabilidad de asimilación y/ bioacumulación de acetaminofén, como lo afirma Santaefemia et al. (2018) que la biomasa viva de *Chorella sp* genera una alta posibilidad de almacenar grandes cantidades de contaminantes (bioacumulación) o transformarlos en formas menos activas (biotransformación), mejorando el proceso de eliminación.

El ministerio de salud lo cataloga al paracetamol e ibuprofeno como los dos analgésicos más comunes y populares en el mundo, el uso cotidiano y a gran escala de paracetamol (N-(4-hidroxifenil) acetamida), especialmente en el Perú donde se tiene una cultura de automedicación; El acetaminofén una vez administrados, puede excretarse del organismo sin sufrir ninguna transformación, o pueden metabolizarse mediante reacciones de oxidación, reducción, hidrólisis y alquilación, o bien formar conjugados más polares e hidrofílicos que se excretan en la orina o la bilis (Heberer, 2012), la excreción de estos fármacos, va a depender de sus características y principios activos (Sorensen et al., 2015).; el desarrollo de investigaciones sobre el uso de tratamientos biológicos como *Chorella sp* y la eficiencia de remoción de acetaminofén obtenidas en la investigación ha demostrado la absorción eficiente principalmente de fármacos como el acetaminofén desde medios líquidos, incorporándolos en su organismo para la generación de biomasa (Markou y Georgakakis, 2011).

Los fármacos o productos de degradación debido a su alta polaridad y baja volatilidad, la mayoría de los productos farmacéuticos son más susceptibles de ser transportados a la columna de agua (Zhang, et al. 2014).

CAPÍTULO V

CONCLUSIONES

Se determinó la concentración de 0,042 mgL⁻¹ de acetaminofén en el efluente de la planta de tratamiento de aguas residuales de Celendín, su presencia en las aguas residuales es atribuido a los organismos que lo consumen y lo excretan entre el 85 al 90 %, lo que significa que el acetaminofén va a parar a través de los sistemas de alcantarillado directamente en las plantas de tratamiento de aguas residuales en su forma química o sus derivados.

El experimento se mantuvo constantemente monitoreado a través de criterios técnicos de funcionamiento y parámetros de campo, oxígeno disuelto promedio de 16,6 mgO₂ L⁻¹, temperatura promedio de 21,20 °C, potencial de hidrogeno promedio de 7,23, tiempo de retención hidráulica de 5 días, volumen de los fotobiorreactores 1 litro, luz directa con una intensidad de 2000 Lux, fotoperiodo de 12:12 horas y la inyección de aire y agitación a un caudal de 10 Lmin⁻¹.

La remoción de acetaminofén del efluente de la planta de tratamiento de aguas residuales de Celendín, Cajamarca, 2022 fue de 97,72% con una desviación estándar de 0,011, menor al 2%, en el tratamiento T_{300R1}, T_{300R2} y T_{300R3} diseñado bajo el contenido de agua residual + 300 mL de *Chorella sp* + 4 mg acetaminofén, la eficiencia de remoción de acetaminofén es atribuido a *Chlorella sp* determinada por una relación directamente proporcional.

RECOMENDACIONES

Para posteriores investigaciones se recomienda realizar un análisis con marcadores para acetaminofén a fin de determinar la absorción o adsorción en la microalga *Chlorella sp.*

Considerar la aplicación de tratamiento con concentraciones de distribución aritmética, a fin de evaluar la eficiencia de remoción a concentraciones diferidas.

Utilizar disoluciones patrón del contaminante a concentración conocida, a fin de evitar la alteración en el peso de acetaminofén, que, por ser pesos de alta precisión, el margen de error es mucho mayor.

CAPÍTULO VI

LISTA DE REFERENCIAS

- Arbeláez, P. (2016). Contaminantes emergentes en aguas residuales, de río y fangos de depuradoras (tesis doctoral). Universidad de Rovira/Vorgili. Tarragona
- Barceló L. D. y López de Alda M. J. 2018. Contaminación y calidad química del agua: el problema de los contaminantes emergentes. Fundación Nueva Cultura del Agua. Panel Científico-Técnico de seguimiento de la política de aguas. Recuperado de: https://fnca.eu/phocadownload/P.CIENTIFICO/inf_contaminacion.pdf
- Bhola, R., Desikan, S., Santosh, K., Subburamu, E., Saaiyasi, F., y Bux, E. (2011). Effects of parameters affecting biomass yield and thermal behaviour of *Chlorella vulgaris*. *J. Biosci. Bioeng.* 111 (2011) 377–382. Recuperado de: 10.1016/j.jbiosc.2010,11,006.
- Bretón, R. y Boxall, A., 2003. Farmacéuticos y de higiene personal en el medio ambiente: los conductores de regulación y necesidades de investigación. *Sharton y Ciencia combinatoria*, 22 (3). Disponible en: <http://www.la-ira.org/productos-farmaceuticos-y-de-higiene-personal-como-contaminantes>
- Brown, J., Pexéus, N., Forlin, L., & Larsson, D. 2007. Variations in bioconcentration of human pharmaceuticals from sawege effluents into fish blood plasma. *Environ. Sci. Bio/Technology*. 13, 321-328.
- Cámpora, P. 2017. Fármacos en el medio ambiente: La contaminación que no vemos. Doctora en ciencias forenses con mención en toxicología. Facultad de ciencias. Universidad San Sebastián. Recuperado de: <http://www.ipsuss.cl/ipsuss/actualidad/medicamentos/farmacos-en-el-medio-ambiente-la-contaminacion-que-no-vemos/2017-09-25/113816.html>
- Castro B. J. (2018). Diseño de una planta piloto para el crecimiento de microalgas heterótrofas. Universidad de Valladolid, España.

- CENTA (Centro de las nuevas tecnologías del agua de Sevilla). 2008. Manual de depuración de aguas residuales. Recuperado de: <http://alianzaporelagua.org/documentos/MONOGRAFICO3.pdf>
- Céspedes B. D. N. (2019). Tratamiento terciario de aguas residuales no domésticas empleando *Chlorella sp.* y conversión de la biomasa microbiana por pirólisis lenta. Pontificia Universidad Javeriana. Bogotá, Colombia.
- Conectividad Educativa de Informática Básica para el Aprendizaje en Línea - CEIBAL. 2016. Reino protista – *Chlorella sp.* Recuperado de: https://contenidos.ceibal.edu.uy/fichas_educativas/_pdf/ciencias-naturales/reino-protista/002-chlorella-vulgaris.pdf.
- Cooper, ER, Siewicki, TC y Phillips, K., 2008. Base de datos preliminar de evaluación de riesgos y clasificación de riesgos de los productos farmacéuticos en el medio ambiente. *Ciencia del medio ambiente total*, 398 (1), pp.26-33
- Daughton, CG y Ruhoy, es decir, 2009. Huella ambiental de los productos farmacéuticos: la importancia de los factores más allá de la excreción directa a las alcantarillas. *Toxicología y Química Ambiental*, 28 (12), pp.2495-2521.
- De Wilt A., Butkovskyi A., Tuantet K., Leal L. H., Fernandez T. T., Langenhoff A. & Zeeman G. 2016. Micropollutant removal in an algal treatment system fed with source separated wastewater streams. *J. Hazard. Mater.* 304, 84-92.
- Drewes J. E., Fox P. & Jekei M. 2021. Occurrence of iodinate x-ray contrast media in domestic effluents and their fate during indirect potable reuse. *J. Environ. Sci. Health. A. Tox. Hazard Subst. Environ. Eng.* 36, 1633-45.
- Ecured. 2008. Tratamiento de aguas residuales. Recuperado de: https://www.ecured.cu/Tratamiento_de_aguas_residuales.
- Escapa, C., Coimbra, RN, Paniagua, S., García, AI y Otero, M. 2015. Nutrients and pharmaceuticals removal from wastewater by culture and harvesting of *Chlorella sorokiniana*. Recuperado de: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0960852415002953>

- Escapa, C., Coimbra, RN, Paniagua, S., García, AI y Otero, M. 2016. Paracetamol and salicylic acid removal from contaminated water by microalgae. Recuperado de: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27421699/>
- Escapa, C., Nuno de Coimbra, R., Paniagua, S. García, A., y Otero, M. 2017. Comparative Assessment of Pharmaceutical Removal from Wastewater by the Microalgae *Chlorella sorokiniana*, *Chlorella vulgaris* and *Scenedesmus obliquus*. Intech. Open science. Recuperado de: <http://dx.doi.org/10.5772/66772>.
- Eskualdeko Farmakoterapi Informazioa - Información Farmacoterapéutica de la Comarca. (2016). Farmacontaminación: Impacto ambiental de los medicamentos. Boletín INFAC, Vol 24 N° 10 59 - 64. Recuperado de: https://www.euskadi.eus/contenidos/informacion/cevime_infac_2016/es_def/adjuntos/INFAC_Vol_24_n_10_farmacontaminacion.pdf
- European Medicines Agency (EMA). 2018. Guideline on the environmental risk assessment of medicinal products for human use EMA/CHMP/SWP/4447/00 Rev. 1. Recuperado de: https://www.ema.europa.eu/en/documents/scientific-guideline/draft-guideline-environmental-risk-assessment-medicinal-products-human-use-revision-1_en.pdf.
- Gil M. J., Soto A. M., Usma, J. I. y Gutiérrez O. D. 2012. Contaminantes emergentes en aguas, efectos y posibles tratamientos.
- Gómez C., Morales-Amaral M., Acién F., Escudero, R., Fernández J. & Molina-Grima E. 2015. Utilization of secondary treated wastewater for the production of freshwater microalgae. *Appl. Microbiol. Biotech.* 99, 6391-6944.
- Gómez, C., Escudero, r., Morales, M., Figueroa, F., Fernanández, J., & Acié, F. 2013. Use of secondary - treated wastewater for the production of *Muriellopsis* sp, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 97, 2239 - 2249.
- Gonçalves, A., Pires, J. y Simões, M. 2016. A review on the use of microalgal consortia for wastewater treatment. Recuperado de: <https://pubag.nal.usda.gov/catalog/5587232>

- Heberer, T. 2012. Tracking persistent pharmaceutical residues from municipal sewage to drinking water. 266, 175-189.
- Hernández, A. (2014). Microalgas, cultivo y beneficios. Revista de biología marina y oceanografía. Recuperado de: https://www.researchgate.net/publication/267629066_Microalgas_cultivo_y_beneficios.
- Hernández, R.; Fernández, C. y Baptista, P. 2008. Metodología de la investigación. 4 ed. México. Editorial McGraw-Hill. 850 pág.
- iAgua Magazine. 2014. Tratamiento de Aguas: La tecnología busca financiación. Recuperado de: <https://www.iagua.es/magazine/4>
- Kalyva, M. 2017. Fate of pharmaceuticals in the environment - A review. Recuperado de: <https://umu.diva-portal.org/smash/get/diva2:1085088/FULLTEXT01.pdf>
- López, S., Facundo, f., y Moroña, L. 2015. Aislamiento, identificación y cultivo de *Chlorella vulgaris* con potencial para suplemento nutricional de peces. Recuperado de: [316675217_Aislamiento_identificacion_y_cultivo_de_Chlorella_vulgaris_con_potencial_para_suplemento_nutricional_de_peces](https://www.researchgate.net/publication/316675217_Aislamiento_identificacion_y_cultivo_de_Chlorella_vulgaris_con_potencial_para_suplemento_nutricional_de_peces).
- Manousi, N.; Karavasili, C.; Fatouros, D.G.; Tzanavaras, P.D.; Zacharis, C.K. Development and Validation of an HPLC-UV Method for the Dissolution Studies of 3D-Printed Paracetamol Formulations in Milk-Containing Simulated Gastrointestinal Media. *Pharmaceuticals* 2022, 15, 755. <https://doi.org/10.3390/ph15060755>
- Nief Rahman Ahmed. HPLC Method for Determination of Paracetamol in Pharmaceutical Formulations and Environmental. Water Samples. *Chemical Science Transactions*. 2019, 8(2), 237-243. DOI:10.7598/cst2019.1486
- Markou, G y Georgakakis, D. 2011. Cultivation of filamentous cyanobacteria (blue-green algae) in agro-industrial wastes and wastewaters: A review. Disponible en: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0306261910005623?via%3Dihub>

- Matamoros, V; Uggetti, E; García, J y Bayona, J. 2015. Assessment of the mechanisms involved in the removal of emerging contaminants by microalgae from wastewater: A laboratory scale study, *Journal of Hazardous Materials*. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jhazmat.2015.08.050>
- Muñoz R & Guleysse B. 2016. Algal-bacterial processes for the treatment of hazardous contaminants: A review. *Water Res.* 40, 2799-2815.
- MVCS (Ministerio de Vivienda Construcción y Saneamiento, PE). 2006. Norma OS 090. Plantas de tratamiento de aguas residuales. Recuperado de: http://www.construccion.org.pe/normas/rne2009/rne2006/files/titulo2/03_OS/RNE2006_OS_090.pdf.
- Navinta Huashuayo, N. L. (2019). Tasa de filtración (TF), en juveniles y adultos, de la almeja *Anodontites trapesialis* para las microalgas *Chlorella vulgaris*, *Scenedesmus obliquus* y *Anabaena* sp. a diferentes concentraciones y temperaturas. Universidad Nacional de San Agustín de Arequipa, Perú.
- Neilson A. H. & Lewin R. A. 2016. The uptake and utilization of organic carbon by algae: an essay in comparative biochemistry. *Phycologia* 13, 227-264.
- Nief Rahman Ahmad and Farha Khalaf Omar. Hplc method for determination of paracetamol in pharmaceutical formulations and environmental water samples. *World Journal of Pharmaceutical Research*. 2018. Volume 7, Issue 15, 124-133
- Norvill Z. N., Shilton A. & Guieysse B. 2016 Emerging contaminant degradation and removal in algal wastewater treatment ponds: Identifying the research gaps. *J. Hazard. Mater.* 313, 291-309.
- Oaks JL, Gilbert M, Virani MZ, Watson RT, Meteyer CU, Rideout BA, Shivaprasad HL, Ahmed S, Chaudhry MJ, Arshad M, Mahmood S, Ali A, Khan AA. 2004. Diclofenac residues as the cause of vulture population decline in Pakistan. Recuperado de: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14745453>
- Organismo de Evaluación y Fiscalización Ambiental. 2012. Fiscalización ambiental en aguas residuales. Recuperado de: https://www.oefa.gob.pe/?wpfb_dl=7827.

- Palmer, C. 2009. A composite ratinf of algae tolerating organic pollution. 5, 78-82
- Parladé et al. (2017). Efecto de las condiciones de cultivo sobre la eliminación β -estradiol en laboratorio y en planta piloto fotobiorreactores por un consorcio algal-bacteriano tratamiento de aguas residuales urbanas. Recuperado de: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0043135418301738>
- Pedroza H, Discovskyi L. Sistema de análisis estadístico con SPSS. Managua, Nicaragua. LITONIC. 2006.
- Pérez, E. y Camacho, L. 2011. Tecnología para el tratamiento de aguas servidas. Recuperado de: <http://cdigital.uv.mx/bitstream/123456789/29490/1/PerezAlarconyCamachoAlcala.pdf>.
- Prieto M. I. 2020. Estudio del crecimiento de la microalga *Chlorella vulgaris* y su capacidad de depuración de agua residual. Recuperado de: <http://repositorio.ual.es/bitstream/handle/10835/9896/PRIETO%20MARQUEZ%2C%20INMACULADA.pdf?sequence=1&isAllowed=y>
- Quinn, B., Gagne, F., & Blaise, C. 2009. Evaluation of the acute, chronic and teratogenic effects of a mixture of eleven pharmaceuticals on the cnidarin, *Hydra attenuata*. *Sci. Total Environ.* 407, 1072, 1079
- Ramanan, R., Kim, B., Cho, D., Oh, H. y Kim, H. 2016. Algae-bacteria interactions: Evolution, ecology and emerging applications. Recuperado de: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0734975015300586>
- Ritchmon A. 2004. Handbook of Microalgal Mass Culture. Disponible en: https://www.academia.edu/35862840/Handbook_of_Microalgal_Culture
- Romero, J. A. (2004). Tratamiento de aguas residuales. Teoría y principio de diseño. Recuperado de: <https://es.scribd.com/document/359898671/Tratamiento-de-Aguas-Residuales-J-Romero-pdf>.
- Rosso D., Larson L. E. & Stenstrom M. K. 2008. Aeration of large-escale mncipal wastewater treatment plants: state of the art. *Water Sci Technol.* 57, 973-978

- Salgueiro, J. (2018). Cultivo de microalgas en aguas residuales y aprovechamiento energético de la biomasa algal. (Tesis doctoral). Universidad de Vigo. España.
- Santaeufemia, S., Torres, E. & Abalde, J. (2018). Biosorption of ibuprofen from aqueous solution using living and dead biomass of the microalga *Phaeodactylum tricornutum*. *Journal of Applied Phycolog.* Universidad de Coruña, 471–482. Obtenido de <https://link.springer.com/article/10.1007/s10811-017-1273-5>
- Santos, A., Gonzáles, Y., y Martín, C. 2014. Uso y aplicaciones potenciales de las microalgas. Recuperado de: <https://www.iit.comillas.edu/docs/IIT-14-027A.pdf>.
- Sorensen, H., Nielsen, S., Lanzky, P., Ingerslv, F., Lutzhoft, H., & Jorgensen, S. 2015. Ocurrence, fate and effects of pharmaceutical substances in the environment. A review. *Chemosphere.* 36, 357 – 394
- The American Society of Health-System Pharmacists - ASHP. 2017. Acetaminophe. Disponible en: <https://www.ashp.org/>
- Zhang, D; Tan, S; Gersberg, R; Jern, W; keat, S. (2014). Removal of pharmaceuticals and personal care products in aquatic plant-based systems: Areview. *Environmental Pollution.* 184, p. 620-639.

CAPÍTULO VII

APÉNDICE

Panel fotográfico

Figura 11

Recolección de agua residual de la planta de tratamiento de Celendín.



Figura 12

*Cultivo, escalamiento, mantenimiento y aclimatación de *Chlorella* sp*



Figura 13

Identificación, control y recuento en cámara Neubauer (Microscopio electrónico)

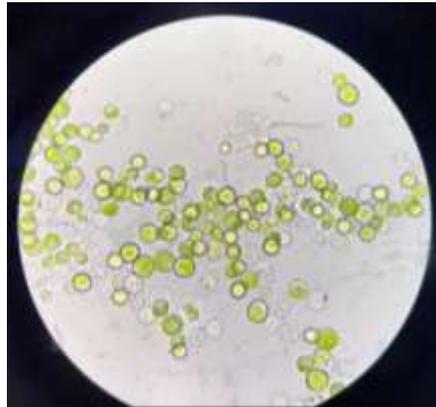


Figura 14

Pesaje de acetaminofén



Figura 15

Instalación del experimento



Figura 16

Monitoreo de parámetros de campo



Figura 17

Muestro y envío a laboratorio



Figura 18

Preparación y procesamiento de muestras en laboratorio de bioquímica UPCH



Figura 19

Corrida de muestras, análisis cuantitativo por HPLC – Laboratorio de bioquímica UPCH



ANEXOS

Resultados de parámetros de campo

Tabla 18

Valores promedio de monitoreo de parámetros de campo

Tratamiento	Oxígeno disuelto (OD) mgO ² L-1	pH	Temperatura °C	Tiempo de retención hidráulica días	Volumen L
TC-00 R1	16,5	7,14	19,5	5	1
TC-00 R2	16,4	7,18	19,5	5	1
TC-00 R3	16,1	7,11	21	5	1
TC+04 R1	17	7,1	22,5	5	1
TC+04 R2	16,6	7,12	24	5	1
TC+04 R3	16,7	7,15	24	5	1
T ₁₀₀ R1	16,4	7,19	23	5	1
T ₁₀₀ R2	16,7	7,12	21	5	1
T ₁₀₀ R3	16,9	7,1	20	5	1
T ₂₀₀ R1	16,3	7,18	19	5	1
T ₂₀₀ R2	16,8	7,5	18	5	1
T ₂₀₀ R3	16,4	7	19	5	1
T ₃₀₀ R1	16,9	7,4	23	5	1
T ₃₀₀ R2	16,5	7,7	22	5	1
T ₃₀₀ R3	16,8	7,5	22,5	5	1
Promedio	16,6	7,23	21,20	5	1

Cromatogramas de cuantificación de acetaminofén.

Figura 20

Cromatograma del estándar de acetaminofén.

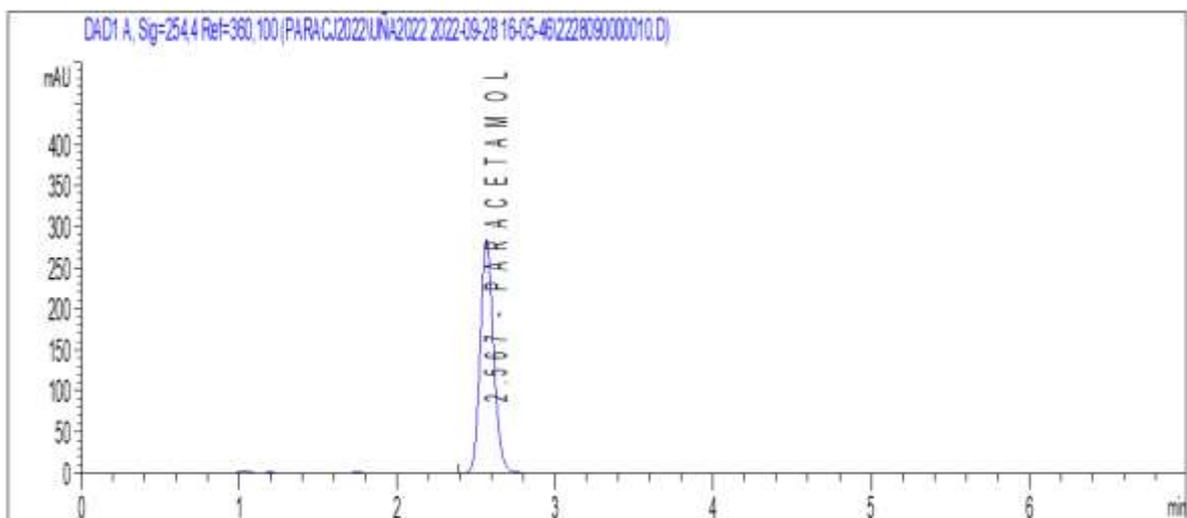


Figura 21

Cromatograma del blanco, agua residual sin enriquecer con soluciones de estándar de acetaminofén.

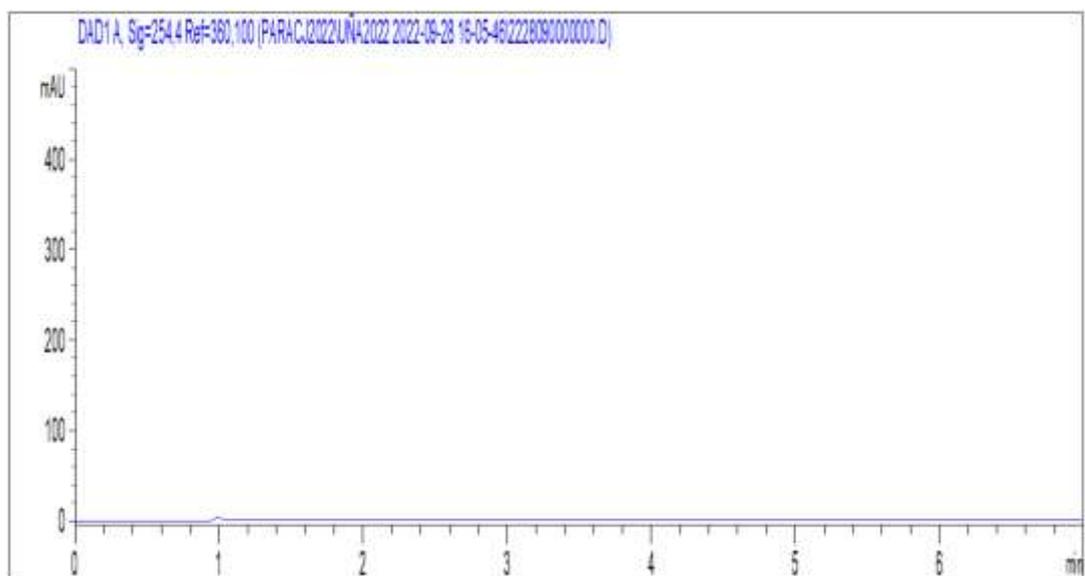


Figura 22

Cromatograma de la muestra de agua residual enriquecidas con acetaminofén 4.1 ug mL⁻¹.

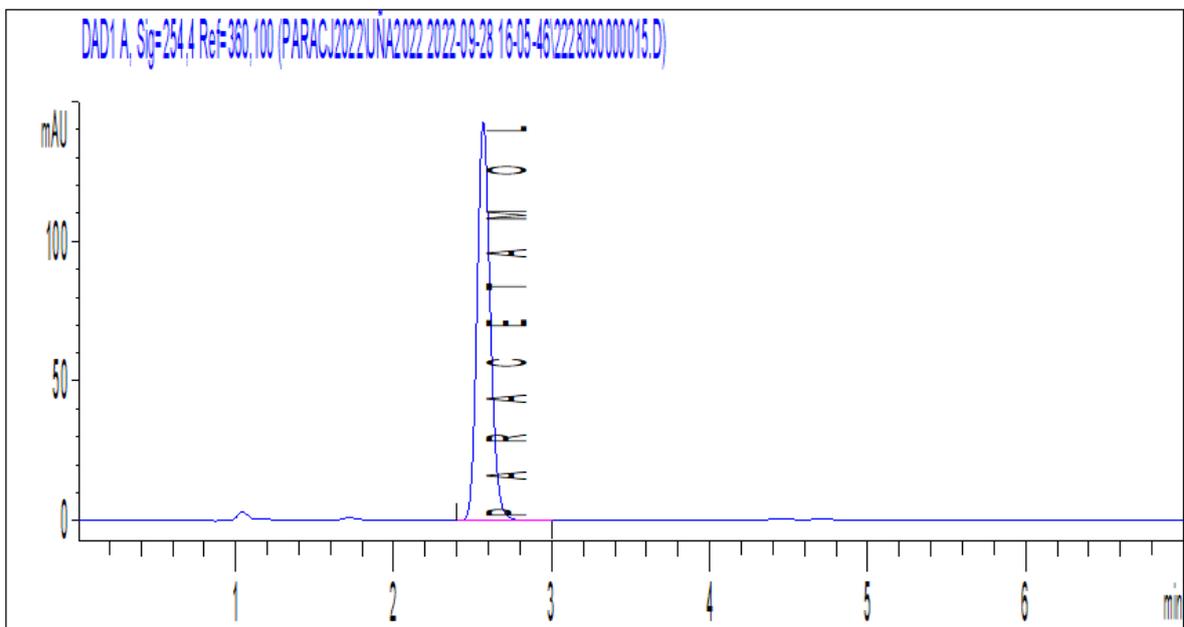


Figura 23

Cromatograma de la muestra T_{100R1}: Agua residual + 100 mL de *Chorella sp* + 4 mg acetaminofén.

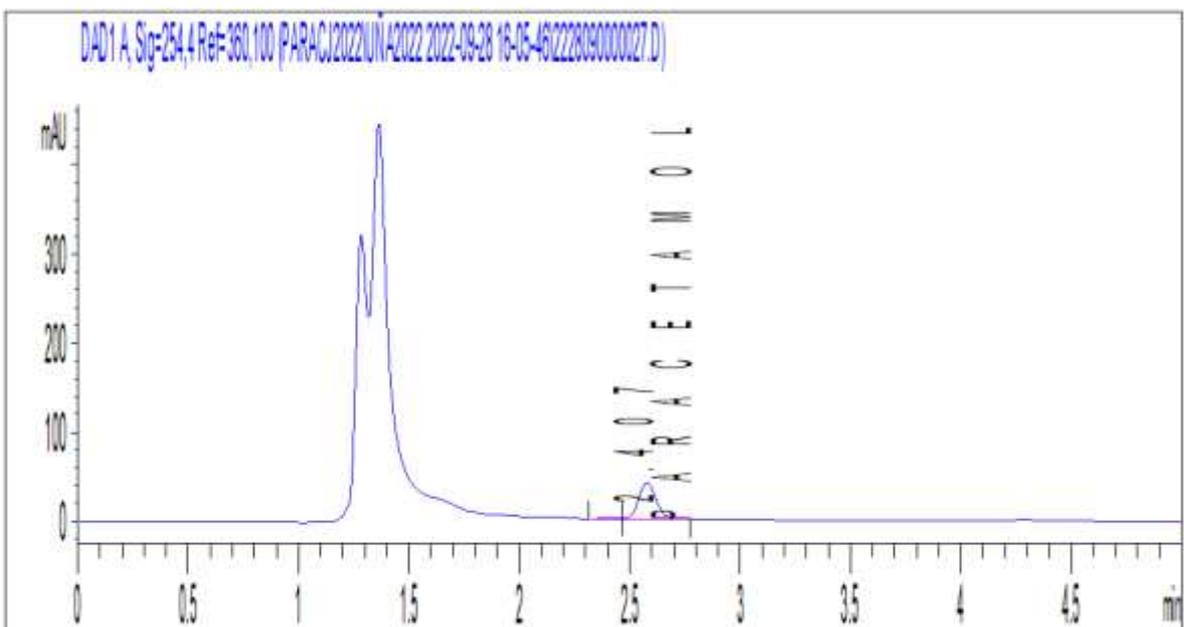


Figura 24

Cromatograma de la muestra T_{100R2}: Agua residual + 100 mL de Chorella sp + 4 mg acetaminofén.

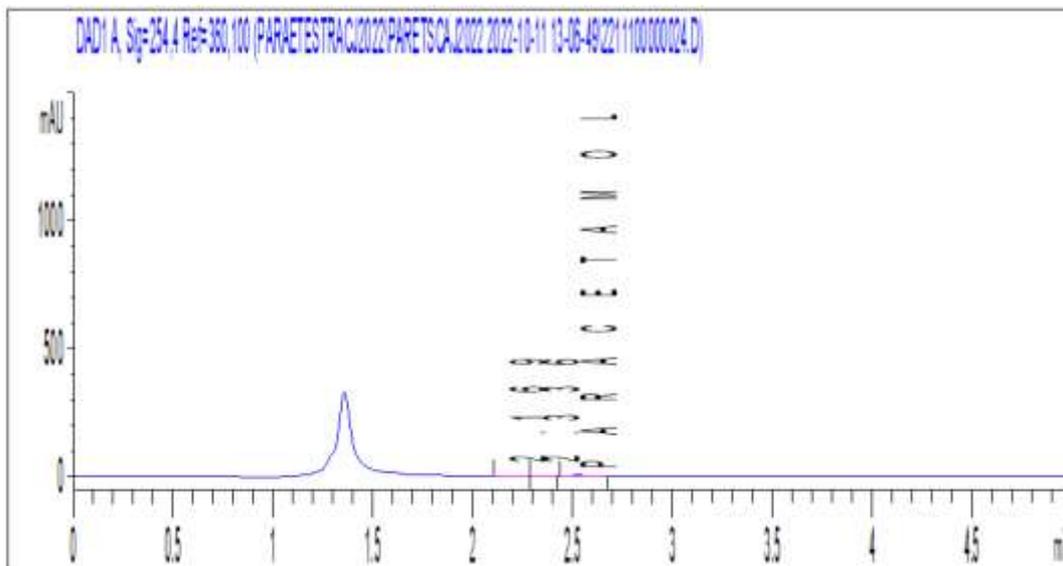


Figura 25

Cromatograma de la muestra T_{100R3}: Agua residual + 100 mL de Chorella sp + 4 mg acetaminofén/Litro

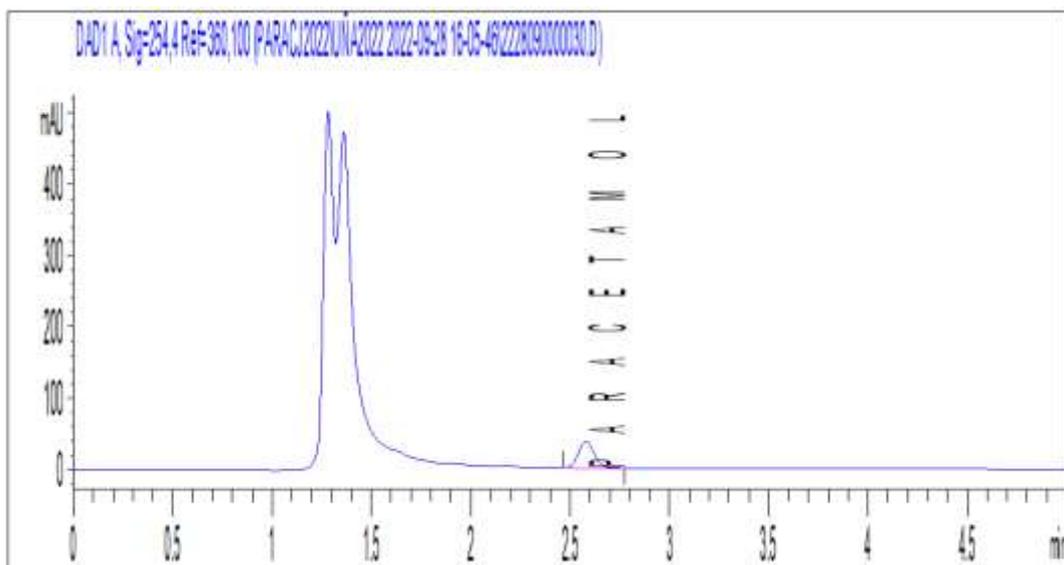


Figura 26

Cromatograma de la muestra T_{200R1}: Agua residual + 200 mL de Chorella sp + 4 mg acetaminofén.

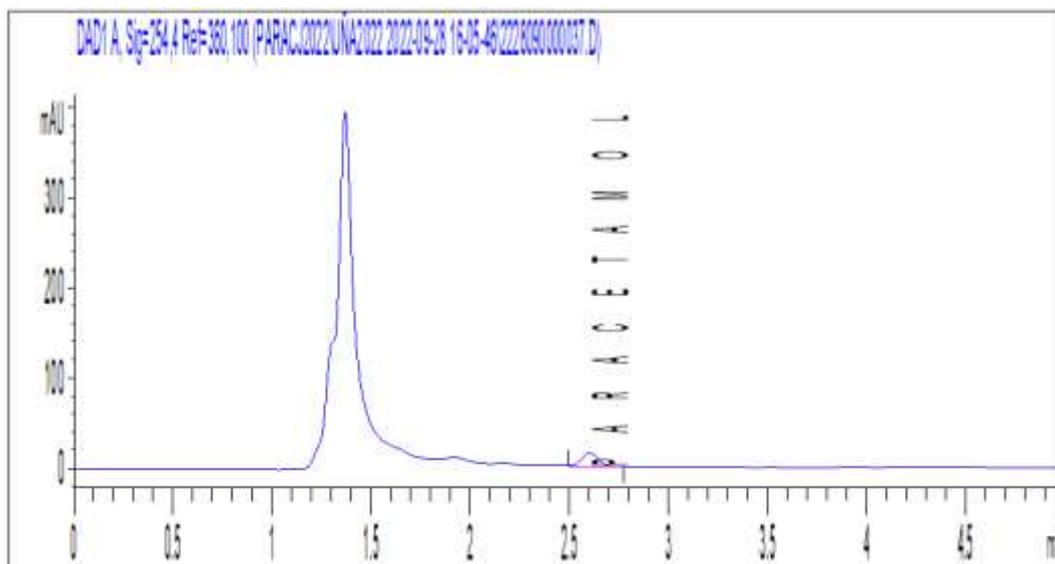


Figura 27

Cromatograma de la muestra T_{200R2}: Agua residual + 200 mL de Chorella sp + 4 mg acetaminofén.

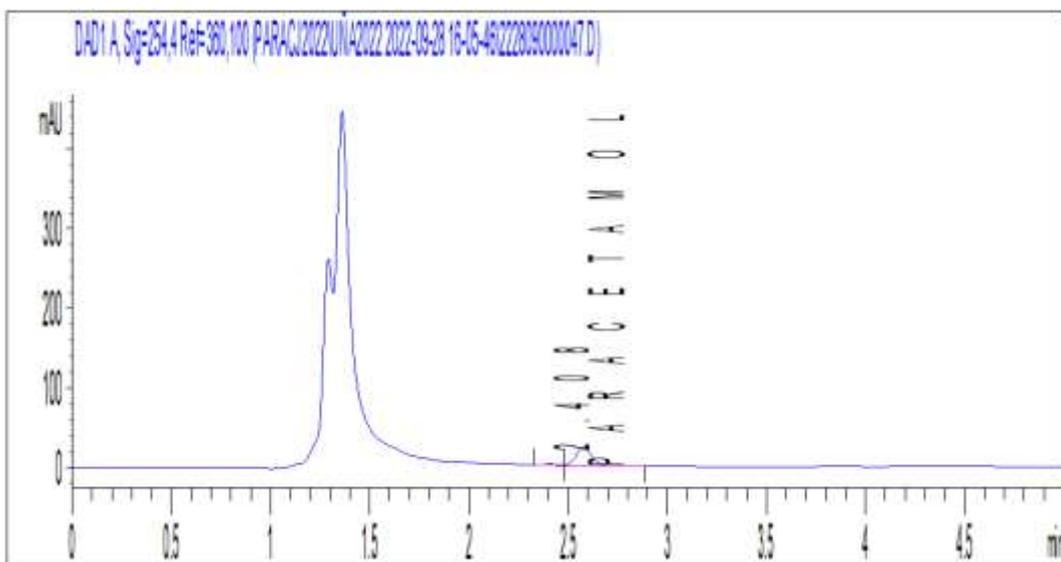


Figura 28

Cromatograma de la muestra T_{200R3}: Agua residual + 200 mL de Chorella sp + 4 mg acetaminofén/Litro

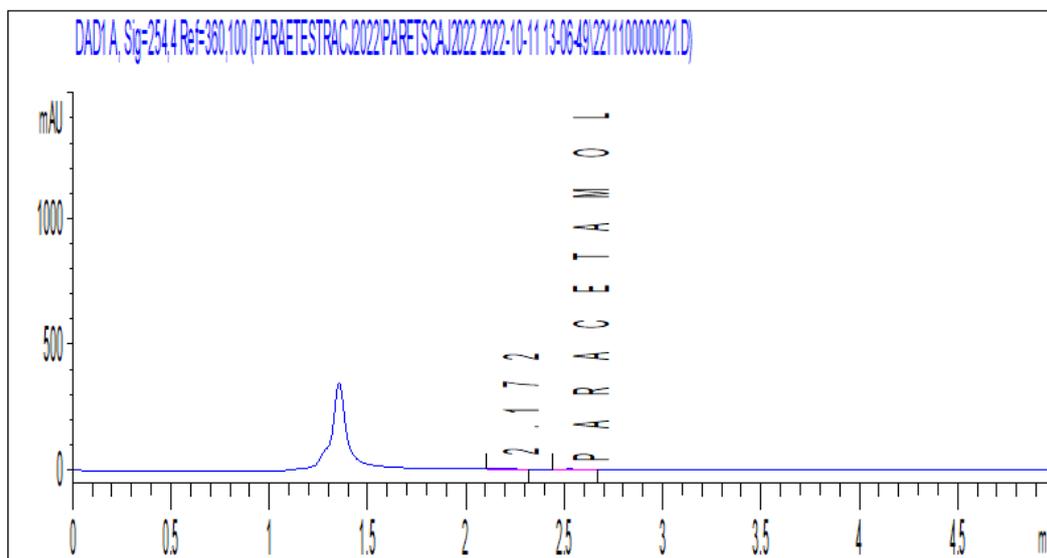


Figura 29

Cromatograma de la muestra T_{300R1}: Agua residual + 300 mL de Chorella sp + 4 mg acetaminofén.

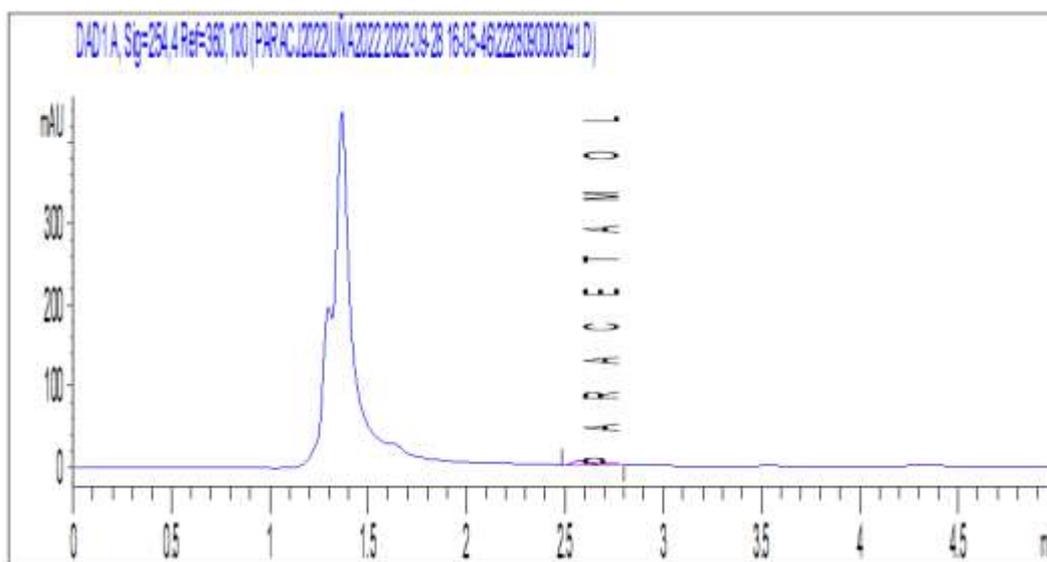


Figura 30

Cromatograma de la muestra T_{300R2} : Agua residual + 300 mL de *Chorella sp* + 4 mg acetaminofén.

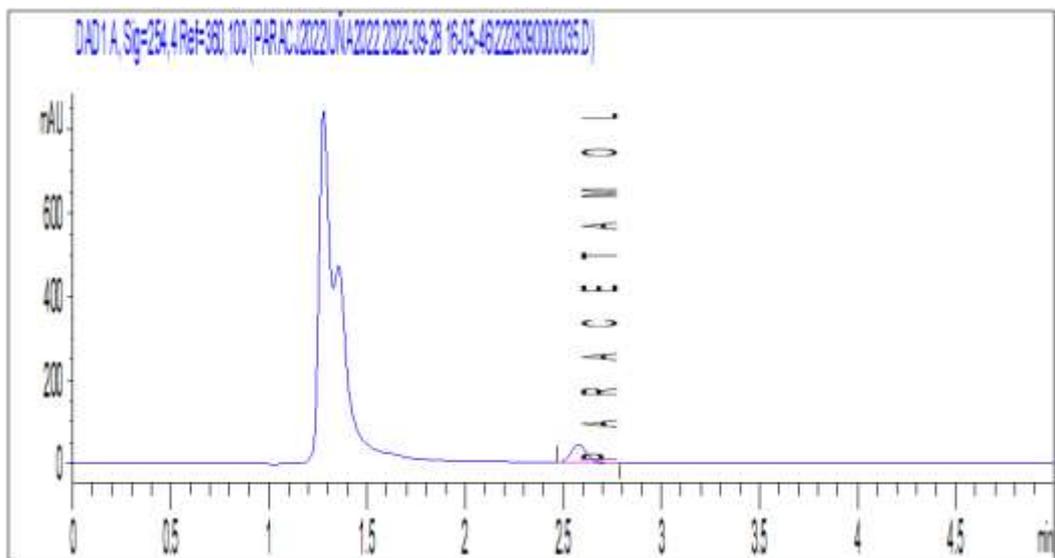
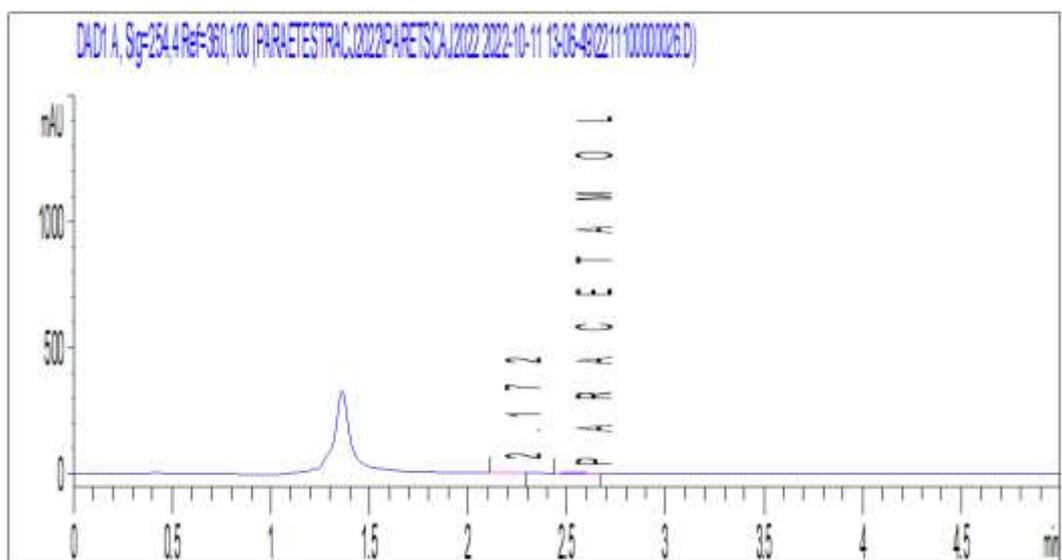


Figura 31

Cromatograma de la muestra T_{300R3} : Agua residual + 300 mL de *Chorella sp* + 4 mg acetaminofén.



Análisis estadístico

Prueba de normalidad de eficiencia de remoción de acetaminofén

Tabla 19

Prueba de normalidad de eficiencia de remoción de acetaminofén

	Casos					
	Válido		Perdidos		Total	
	N	Porcentaje	N	Porcentaje	N	Porcentaje
Eficiencia de remoción de acetaminofén	9	100,0%	0	0,0%	9	100,0%

	Kolmogorov-Smirnov ^a			Shapiro-Wilk		
	Estadístico	gl	Sig.	Estadístico	gl	Sig.
Eficiencia remoción de acetaminofén	0,229	9	0,192	0,837	9	0,054

H0: la eficiencia de remoción de acetaminofén se distribuye de forma normal

H1: la eficiencia de remoción de acetaminofén no se distribuye de forma normal

Con un nivel de significancia de 0,054 ($P_{valor} > 0,05$) no podemos rechazar la hipótesis nula, por lo tanto, la eficiencia de remoción de acetaminofén tuvo una distribución normal y cumplimos con el primer supuesto de normalidad de la variable dependiente (eficiencia de remoción de acetaminofén).

Prueba de homogeneidad de la densidad poblacional de *Chlorella sp* de F de Levene

Tabla 20

Prueba de homogeneidad de la densidad poblacional de Chlorella sp de F de Levene

		Estadístico de Levene	gl1	gl2	Sig.
Remoción de Acetaminofén	Se basa en la media	3,276	2	6	0,109
	Se basa en la mediana	2,272	2	6	0,184
	Se basa en la mediana y con gl ajustado	2,272	2	2,712	0,263
	Se basa en la media recortada	3,212	2	6	0,113

H0: la densidad poblacional de *Chlorella sp* tiene varianza homogénea

H1: la densidad poblacional de *Chlorella sp* tiene varianza diferentes

Con un nivel de significancia de 0,109 (Pvalor>0.05) no podemos rechazar la hipótesis nula, por lo tanto, la densidad poblacional de *Chlorella sp* tiene varianzas iguales, se cumple el segundo supuesto para usar el ANOVA.

Análisis de varianza – ANOVA

Tabla 21

Análisis de varianza – ANOVA

	(I) Adicción de Densidad Poblacional	Diferencia de medias (I-J)	Desv. Error	Sig.	Intervalo de confianza al 95%	
					Límite inferior	Límite superior
100	200	,43333*	0,07128	0,002	0,2146	0,6521
	300	,62667*	0,07128	0,000	0,4079	0,8454
200	100	-,43333*	0,07128	0,002	-0,6521	-0,2146
	300	0,19333	0,07128	0,078	-0,0254	0,4121
300	100	-,62667*	0,07128	0,000	-0,8454	-0,4079
	200	-0,19333	0,07128	0,078	-0,4121	0,0254

* La diferencia de medias es significativa en el nivel 0,05

H0: las medias de la densidad poblacional de *Chlorella sp* son iguales

H1: las medias de la densidad poblacional de *Chlorella sp* son distintas

Con un nivel de significancia de 0,65 ($P_{\text{valor}} > 0,05$) se rechaza la hipótesis nula, por lo tanto, acepta la hipótesis alternativa, o sea que, las medias de la densidad poblacional de *Chlorella* sp son distintas.

Prueba de Tukey

Tabla 22

Prueba de Tukey

Adición de densidad poblacional	N	Subconjunto para alfa = 0,05	
		1	2
300	3	0,0833	
200	3	0,2767	
100	3		0,7100
Sig.		0,078	1,000

Se visualizan las medias para los grupos en los subconjuntos homogéneos

Prueba de variación de medias

Tabla 23

Prueba de variación de medias

	N	Válido	3
		Perdidos	0
R1	Media		0,3233
	Mínimo		0,08
	Máximo		0,76
	N	Válido	3
		Perdidos	0
R2	Media		0,4067
	Mínimo		0,09
	Máximo		0,72
	N	Válido	3
		Perdidos	0
R3	Media		0,3400
	Mínimo		0,08
	Máximo		0,65

Entonces si existe diferencia entre los tratamientos a diferente densidad poblacional de *Chlorella* sp, por lo tanto, si existe diferencia significativa entre el tratamiento con la adición de 4 mgL-1 de acetaminofén en el tratamiento con 100 mL de *Chlorella* sp y el tratamiento con 300 mL de *Chlorella* sp; La media del tratamiento con 300 mL de *Chlorella* sp (1,1467) en comparación con la media del tratamiento con 100 mL de *Chlorella* sp (0,1400), entonces, el tratamiento con 300 mL de *Chlorella* sp supera en un punto de media al tratamiento con 100 mL de *Chlorella* sp.

Prueba de homogeneidad de la densidad poblacional de *Chlorella* sp de F de Levene

Tabla 24

Prueba de homogeneidad de la densidad poblacional de Chlorella sp de F de Levene

		Estadístico de Levene	gl1	gl2	Sig.
Remoción de acetaminofén	Se basa en la media	3,276	2	6	0,109
	Se basa en la mediana	2,272	2	6	0,184
	Se basa en la mediana y con gl ajustado	2,272	2	2,71 2	0,263
	Se basa en la media recortada	3,212	2	6	0,113

(I) Adición de Densidad Poblacional		Diferencia de medias (I-J)	Desv. Error	Sig.	Intervalo de confianza al 95%	
					Límite inferior	Límite superior
100	200	,43333*	0,07128	0,002	0,2146	0,6521
	300	,62667*	0,07128	0,000	0,4079	0,8454
200	100	-,43333*	0,07128	0,002	-0,6521	-0,2146
	300	0,19333	0,07128	0,078	-0,0254	0,4121
300	100	-,62667*	0,07128	0,000	-0,8454	-0,4079
	200	-0,19333	0,07128	0,078	-0,4121	0,0254

Adición de densidad poblacional	N	Subconjunto para alfa = 0,05	
		1	2
300	3	0,071	
200	3	0,2767	
100	3		0,0833
Sig.		0,078	1,000

Se visualizan las medias para los grupos en los subconjuntos homogéneos

	N	Válido	3
		Perdidos	0
100	Media		0,0833
	Mínimo		0,08
	Máximo		0,09
	N	Válido	3
		Perdidos	0
200	Media		0,2767
	Mínimo		0,13
	Máximo		0,41
	N	Válido	3
		Perdidos	0
300	Media		0,71
	Mínimo		0,65
	Máximo		0,79

Cotización N° P009-2021 análisis cuantitativo de acetaminofén (HPLC)

Informe técnico N° IT084-2022