

**UNIVERSIDAD NACIONAL DE CAJAMARCA**

**ESCUELA DE POSGRADO**



**UNIDAD DE POSGRADO DE LA FACULTAD DE CIENCIAS  
AGRARIAS**

**PROGRAMA DE DOCTORADO EN CIENCIAS**

**TESIS:**

**EFFECTO DE LA DENSIDAD POBLACIONAL DE *Chlorella sp* EN LA  
REMOCIÓN DE ETINILESTRADIOL DEL EFLUENTE DE LA  
PLANTA DE TRATAMIENTO DE AGUA RESIDUAL DE CELENDÍN,  
CAJAMARCA, PERÚ, 2021 - 2022**

Para optar el Grado Académico de

**DOCTOR EN CIENCIAS**

**MENCIÓN: GESTIÓN AMBIENTAL Y RECURSOS NATURALES**

Presentada por:

**M.Sc. AZUCENA CHÁVEZ COLLANTES**

Asesor:

**Dr. EDIN EDGARDO ALVA PLASENCIA**

Cajamarca, Perú

2023

COPYRIGHT © 2023 POR  
**AZUCENA CHÁVEZ COLLANTES**  
Todos los derechos reservados

# UNIVERSIDAD NACIONAL DE CAJAMARCA

## ESCUELA DE POSGRADO



### UNIDAD DE POSGRADO DE LA FACULTAD DE CIENCIAS AGRARIAS

#### PROGRAMA DE DOCTORADO EN CIENCIAS

#### TESIS APROBADA:

**EFFECTO DE LA DENSIDAD POBLACIONAL DE *Chlorella sp* EN LA  
REMOCIÓN DE ETINILESTRADIOL DEL EFLUENTE DE LA  
PLANTA DE TRATAMIENTO DE AGUA RESIDUAL DE CELENDÍN,  
CAJAMARCA, PERÚ, 2021 - 2022**

Para optar el Grado Académico de

#### **DOCTOR EN CIENCIAS**

**MENCIÓN: GESTIÓN AMBIENTAL Y RECURSOS NATURALES**

Presentada por:

**M.Sc. AZUCENA CHÁVEZ COLLANTES**

#### **JURADO EVALUADOR**

Dr. Edin Edgardo Alva Plasencia  
Asesor

Dra. Consuelo Belania Plasencia Alvarado  
Jurado evaluador

Dra. Leticia Noemí Zavaleta Gonzáles  
Jurado Evaluador

Dr. Alejandro Claudio Lagos Manrique  
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 DOCTORADO EN CIENCIAS**

**ACTA DE SUSTENTACIÓN DE TESIS**

**MENCIÓN: GESTIÓN AMBIENTAL Y RECURSOS NATURALES**

Siendo las 8:00 horas del día 09 de marzo del año 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**, **Dra. LETICIA NOEMÍ ZAVALETA GONZÁLES**, **Dr. ALEJANDRO CLAUDIO LAGOS MANRIQUE**, y en calidad de Asesor el **Dr. EDÍN EDGARDO ALVA PLASENCIA**; Actuando de conformidad con el Reglamento Interno de la Escuela de Posgrado y el Reglamento del Programa de Doctorado de la Escuela de Posgrado de la Universidad Nacional de Cajamarca, se inició la SUSTENTACIÓN de la tesis titulada: **EFECTO DE LA DENSIDAD POBLACIONAL DE *Chorella* sp EN LA REMOCIÓN DE ETINILESTRADIOL DEL EFLUENTE DE LA PLANTA DE TRATAMIENTO DE AGUA RESIDUAL DE CELENDÍN, CAJAMARCA, PERÚ, 2021 - 2022** ; Presentada por la **Maestro en Ciencias Mención Ordenamiento Territorial y Gestión del Riesgo de Desastres AZUCENA CHÁVEZ COLLANTES**.

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 BIEN (17) EXCELENTE la mencionada Tesis; en tal virtud, la **Maestro en Ciencias Mención Ordenamiento Territorial y Gestión del Riesgo de Desastres, AZUCENA CHÁVEZ COLLANTES**, está apta para recibir en ceremonia especial el Diploma que la acredita como **DOCTOR EN CIENCIAS**, de la Unidad de Posgrado de la Facultad de Ciencias Agrarias, Mención: **GESTIÓN AMBIENTAL Y RECURSOS NATURALES**.

Siendo las 9:15 horas del mismo día, se dio por concluido el acto.

.....  
**Dr. Edín Edgardo Alva Plasencia**  
Asesor

.....  
**Dra. Consuelo Belania Plasencia Alvarado**  
Presidente-Jurado Evaluador

.....  
**Dra. Leticia Noemi Zavaleta Gonzales**  
Jurado Evaluador

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

**A:**

Mi papá Shalo y mamá Amada

## AGRADECIMIENTO

A la Escuela de Posgrado de la Universidad Nacional de Cajamarca y docentes; quienes han contribuido con mi formación académica y desarrollo profesional.

A Edin Edgardo Alva Plasencia Dr., asesor de la investigación, por sus aportes y sugerencias en la ejecución y elaboración del informe final de tesis.

A Berardo Escalante Zumaeta Dr.; por la dedicación, apoyo y orientación en la ejecución de la tesis; quien condujo la primera etapa de la investigación.

A León Faustino Villegas Vílchez Dr., docente de la Universidad Peruana Cayetano Heredia; quien contribuyó con la investigación, desde las actividades de laboratorio, análisis e interpretación de resultados; además de sus aportes y valiosa orientación.

A la Universidad Nacional Autónoma de Chota; por las facilidades brindadas para el uso de la cámara de Neubauer del laboratorio de aguas.

A Gustavo Olivos Ramírez Blgo., docente de la Universidad Nacional del Santa; por su apoyo en la orientación y entrega de material de microalgas *Chlorella sp.*

Al personal técnico del Laboratorio Regional del Agua del Gobierno Regional de Cajamarca, por su apoyo con el uso de la centrifuga y otros materiales que ayudaron al procesamiento de los datos de la investigación.

A los miembros del jurado evaluador; por la retroalimentación y aporte, en el desarrollo de la investigación.

A Eisner Will Castillo Rojas Ing., compañero de investigación.

La guerra del hombre contra la naturaleza es una guerra contra sí mismo

- **Rachel Carson**

## ÍNDICE

	<b>Pág.</b>
AGRADECIMIENTO .....	vi
ÍNDICE DE TABLAS .....	x
ÍNDICE DE FIGURAS .....	xii
LISTA DE ABREVIACIONES .....	xiv
RESUMEN .....	xv
ABSTRACT .....	xvi
CAPÍTULO I.....	1
INTRODUCCIÓN.....	1
CAPÍTULO II.....	6
MARCO TEÓRICO .....	6
2.1 ANTECEDENTES.....	6
2.2 BASES TEÓRICAS .....	9
2.2.1 Aguas residuales .....	9
2.2.2 Contaminantes emergentes .....	10
2.2.3 Los fármacos como nuevos contaminantes .....	11
2.2.4 Efectos y riesgos ambientales de los fármacos .....	13
2.2.5 Microalgas .....	13
2.2.6 Parámetros de cultivo en microalgas.....	15
2.2.7 Etinilestradiol.....	17
2.2.8 Tratamiento de aguas residuales .....	18
2.2.9 Aplicación de microalgas en tratamiento de aguas residuales.....	19
2.2.10 Mecanismos para la eliminación de etinilestradiol .....	21
2.3 DEFINICIÓN DE TÉRMINOS BÁSICOS.....	22
2.3.1 Disruptores endocrinos.....	22
2.3.2 Biotransformación.....	22
2.3.3 Metabolitos .....	23
2.3.4 Fármacos.....	23
2.3.5 Hidrofobicidad .....	23
2.3.6 Adsorción.....	24
2.3.7 Absorción.....	24
2.3.8 Hormonas.....	24



2.3.9	Estrógenos.....	24
2.3.10	Anticonceptivos .....	25
CAPÍTULO III	.....	26
MATERIALES Y MÉTODOS	.....	26
3.1.	UBICACIÓN .....	26
3.2.	MATERIALES .....	27
3.3.	METODOLOGÍA .....	29
3.3.1.	Etapa previa y/o campo .....	30
3.3.2.	Etapa de laboratorio .....	36
3.3.3.	Etapa de gabinete .....	46
3.3.4.	Diseño estadístico.....	47
CAPÍTULO IV	.....	48
RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....		48
CAPÍTULO V.....		62
CONCLUSIONES .....		62
CAPÍTULO VI .....		63
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....		63
CAPÍTULO VII .....		73
ANEXOS .....		73

## ÍNDICE DE TABLAS

	Pág.
<b>Tabla 1</b> Contaminantes emergentes, subgrupos y compuestos de interés .....	11
<b>Tabla 2</b> Características del etinilestradiol .....	18
<b>Tabla 3</b> Tratamientos en estudio .....	29
<b>Tabla 4</b> Composición nutricional F/2 Guillard´s.....	31
<b>Tabla 5</b> Diluciones del estándar de Etinilestradiol a partir de la solución madre y el promedio de las áreas de picos obtenidos .....	39
<b>Tabla 6</b> Evaluación de la estabilidad de Etinilestradiol a 4,3 ug mL <sup>-1</sup> .....	41
<b>Tabla 7</b> Precisión del sistema cromatográfico en tiempo de retención y áreas de las señales cromatográficas del estándar de Etinilestradiol a la concentración de 4,04 ug mL <sup>-1</sup> .....	42
<b>Tabla 8</b> Datos para calcular los límites de detección y de cuantificación de Etinilestradiol .....	44
<b>Tabla 9</b> Límites de cuantificación y detección del Etinilestradiol. ....	45
<b>Tabla 10</b> Datos usados para calcular el porcentaje de recuperación de Etinilestradiol en agua residual enriquecida, n=2, tres inyecciones.....	46
<b>Tabla 11</b> Recuperación de Etinilestradiol en agua residual enriquecida, n=2, tres inyecciones .....	46
<b>Tabla 12</b> Concentración de etinilestradiol en el efluente de la PTAR – Celendín .....	48
<b>Tabla 13</b> Concentraciones de los residuos de Etinilestradiol en muestras de agua residual tratadas con microalga <i>Chlorella</i> sp. ....	50
<b>Tabla 14</b> Valores promedios de parámetros de campo .....	52
<b>Tabla 15</b> Concentraciones de los promedios de residuos de Etinilestradiol en muestras de agua residual tratadas con microalgas <i>Chlorella</i> sp. inicial y final. ....	55
<b>Tabla 16</b> Concentración del promedio de residuo de Etinilestradiol en muestras de agua residual tratadas con microalgas <i>Chlorella</i> sp. (100 mL L <sup>-1</sup> , 200 mL L <sup>-1</sup> y 300 mL L <sup>-1</sup> ) inicial y final.....	56
<b>Tabla 17</b> Prueba de normalidad de eficiencia de remoción de etinilestradiol.....	89
<b>Tabla 18</b> Prueba de homogeneidad de la eficiencia de remoción de etinilestradiol de F de Levene.....	89
<b>Tabla 19</b> Análisis de varianza (ANOVA) de eficiencia de remoción de etinilestradiol .	90

<b>Tabla 20</b> Prueba de Tukey .....	90
<b>Tabla 21</b> Prueba de variación de medias .....	91
<b>Tabla 22</b> Prueba de homogeneidad de la densidad poblacional de <i>Chlorella</i> sp., de F de Levene .....	92

## ÍNDICE DE FIGURAS

	<b>Pág.</b>
<i>Figura 1 Estructura molecular del etinilestradiol</i> .....	17
<i>Figura 2 Tratamiento de aguas residuales</i> .....	19
<i>Figura 3 Ubicación de la instalación del proyecto de investigación</i> .....	27
<i>Figura 4 Distribución del sistema de fotobiorreactores</i> .....	30
<i>Figura 5 Conteo en cuadrantes extremos, haciendo uso de la cámara de Neubauer</i> ...	32
<i>Figura 6 Curva de calibración para el estándar de Etinilestradiol.</i> .....	39
<i>Figura 7 Concentraciones de los promedios de residuos de Etinilestradiol en muestras de agua residual tratadas con microalgas Chlorella sp. inicial y final.</i> .....	55
<i>Figura 8 Concentración del promedio de residuo de Etinilestradiol en muestras de agua residual tratadas con microalgas Chlorella sp. (100 mL L<sup>-1</sup>, 200 mL L<sup>-1</sup> y 300 mL L<sup>-1</sup>) inicial y final</i> .....	56
<i>Figura 9 Recolección del agua residual</i> .....	73
<i>Figura 10 Instalación del experimento</i> .....	74
<i>Figura 11 Verificación del sistema de aireación</i> .....	74
<i>Figura 12 Dilución del etinilestradiol con metanol</i> .....	75
<i>Figura 13 Adición del etinilestradiol diluido a cada fotobiorreactor</i> .....	75
<i>Figura 14 Preparación de muestra para envío al laboratorio</i> .....	76
<i>Figura 15 Filtrado del sobrenadante posterior al centrifugado</i> .....	76
<i>Figura 16 Adición de 1mL de metanol</i> .....	77
<i>Figura 17 Agitación de las muestras</i> .....	77
<i>Figura 18 Muestras listas para envío</i> .....	78
<i>Figura 19 Diferencias en el color – probetas del experimento</i> .....	78
<i>Figura 20 Microalga Chlorella sp.</i> .....	79
<i>Figura 21 Preparación del agua acidificada para el cromatógrafo</i> .....	79
<i>Figura 22 Filtrado al vacío de acetonitrilo y metanol para cromatógrafo</i> .....	80
<i>Figura 23 Cromatograma del estándar de Etinilestradiol.</i> .....	80
<i>Figura 24 Cromatograma del blanco, agua residual sin enriquecer con solución de estándar de Etinilestradiol.</i> .....	81
<i>Figura 25 Cromatograma de la muestra de agua residual enriquecidas con Etinilestradiol 4,25 ug mL<sup>-1</sup></i> .....	81

<b>Figura 26</b> Cromatograma de la muestra T18: Agua residual con 100 mL L <sup>-1</sup> de microalgas <i>Chlorella sp</i> + 4 mg Etinilestradiol Litro <sup>-1</sup> .....	82
<b>Figura 27</b> Cromatograma de la muestra T19: Agua residual con 100 mL L <sup>-1</sup> de microalgas <i>Chlorella sp</i> + 4 mg Etinilestradiol Litro <sup>-1</sup> .....	82
<b>Figura 28</b> Cromatograma de la muestra T21: Agua residual con 100 mL L <sup>-1</sup> de microalgas <i>Chlorella sp</i> + 4 mg Etinilestradiol Litro <sup>-1</sup> .....	83
<b>Figura 29</b> Cromatograma de la muestra T16: Agua residual con 200 mL L <sup>-1</sup> de microalgas <i>Chlorella sp</i> + 4 mg Etinilestradiol Litro <sup>-1</sup> .....	83
<b>Figura 30</b> Cromatograma de la muestra T20: Agua residual con 200 mL L <sup>-1</sup> de microalga <i>Chlorella sp</i> + 4 mg Etinilestradiol Litro <sup>-1</sup> .....	84
<b>Figura 31</b> Cromatograma de la muestra T24: Agua residual con 200 mL L <sup>-1</sup> de microalgas <i>Chlorella sp</i> + 4 mg Etinilestradiol Litro <sup>-1</sup> .....	84
<b>Figura 32</b> Cromatograma de la muestra T17: Agua residual con 300 mL L <sup>-1</sup> de microalgas <i>Chlorella sp</i> + 4 mg Etinilestradiol Litro <sup>-1</sup> .....	85
<b>Figura 33</b> Cromatograma de la muestra T22: Agua residual con 300 mL L <sup>-1</sup> de microalgas <i>Chlorella sp</i> + 4 mg Etinilestradiol Litro <sup>-1</sup> .....	85
<b>Figura 34</b> Cromatograma de la muestra T23: Agua residual con 300 mL L <sup>-1</sup> de microalgas <i>Chlorella sp</i> + 4 mg Etinilestradiol Litro <sup>-1</sup> .....	86
<b>Figura 35</b> Certificado de análisis del etinilestradiol – Sigma Aldrich.....	87
<b>Figura 36</b> Cotización de muestras .....	88

## LISTA DE ABREVIACIONES

ARD – Aguas residuales domésticas.

E1 – Estrona.

E2 - 17 $\beta$ -estradiol.

EDAR – Entidades depuradoras de agua residual.

EDC – Disruptores endocrinos químicos (Por sus siglas en ingles).

EE2 - 17 $\alpha$ -etinilestradiol.

DSR – Desviación estándar relativa

FD – Factor de dilución.

LC – Límite de cuantificación

LD – Límite de detección

MVCS – Ministerio de vivienda construcción y saneamiento.

PAR – Radiación fotosintética activa (Por sus siglas en ingles).

PhAC – Compuestos farmacéuticos activos (Por sus siglas en ingles).

PPCP – Productos farmacéuticos y de cuidado personal (Por sus siglas en ingles).

PTAR – Planta de tratamiento de aguas residuales

S/N – Sin número (Localización – Dirección).

UASB - Upflow anaerobic sludge blanket (Manto de lodo anaeróbico de flujo ascendente).

UNC – Universidad Nacional de Cajamarca

## RESUMEN

El objetivo de la investigación fue evaluar el efecto de la densidad poblacional de *Chlorella sp* en la remoción de etinilestradiol del efluente de la planta de tratamiento de agua residual de Celendín, Cajamarca, Perú, 2021 – 2022. Iniciando con la aclimatación de microalgas *Chlorella sp.*, para ser cultivadas en agua residual del efluente de la planta de tratamiento de Celendín. En paralelo, el agua residual fue filtrada al vacío en el laboratorio de aguas de la Universidad Nacional Autónoma de Chota, a fin de eliminar organismos que interfirieran en el proceso de remoción de las microalgas *Chlorella sp*. El experimento contó con seis fotobioreactores testigo y nueve fotobioreactores de tratamiento, a los cuales se añadió *Chlorella sp*, a diferentes concentraciones de biomasa fresca (100, 200 y 300 mL), iniciando con una densidad poblacional de  $2,1 \times 10^6$  cel., y etinilestradiol a concentración de  $4 \text{ mg L}^{-1}$ . Se realizó la toma y envío de muestras cada cinco (05) días por un período de veinte (20) días al laboratorio de la Universidad Peruana Cayetano Heredia, que a través de Cromatografía Líquida de Alta Resolución (HPLC), logró analizarlas. Se evidencia que una concentración de  $300 \text{ mg L}^{-1}$  de *Chlorella sp.*, logró remover un 96,49% de etinilestradiol; a una densidad poblacional de  $200 \text{ mg L}^{-1}$  logró remover 80,92% y a una densidad poblacional de  $100 \text{ mg L}^{-1}$  un 70,65%. Concluyendo que el efecto de la densidad poblacional es determinante en la eficiencia de remoción; a mayor densidad poblacional, mayor porcentaje de remoción.

Palabras claves: *Chlorella sp.*, agua residual, remoción de etinilestradiol.

## ABSTRACT

The objective of the research was to evaluate the effect of the population density of *Chlorella sp* on the removal of ethinylestradiol from the effluent of the Celendín wastewater treatment plant, Cajamarca, Peru, 2021 - 2022. Starting with the acclimatization of *Chlorella sp* microalgae, to be cultivated in residual water from the effluent of the Celendín treatment plant. In parallel, the residual water was vacuum filtered in the water laboratory of the National Autonomous University of Chota, in order to eliminate organisms that interfere in the removal process of *Chlorella sp*. The experiment had six control photobioreactors and nine treatment photobioreactors, to which *Chlorella sp* was added, at different concentrations of fresh biomass (100, 200 and 300 mL), starting with a population density of  $2,1 \times 10^6$  cells, and ethinylestradiol. at a concentration of  $4 \text{ mg L}^{-1}$ . Samples were taken and sent every five (05) days for a period of twenty (20) days to the laboratory of the Universidad Peruana Cayetano Heredia, which through High Resolution Liquid Chromatography (HPLC), was able to analyze them. It is evident that a concentration of  $300 \text{ mg L}^{-1}$  of *Chlorella sp.*, managed to remove 96,49% of ethinylestradiol; at a population density of  $200 \text{ mg L}^{-1}$  it managed to remove 80,92% and at a population density of  $100 \text{ mg L}^{-1}$  70,65%. Concluding that the effect of population density is decisive in removal efficiency; the higher the population density, the higher the percentage of removal.

Keywords: *Chlorella sp.*, wastewater, ethinylestradiol removal.



# CAPÍTULO I

## INTRODUCCIÓN

El crecimiento de la población, seguido del rápido avance de la industrialización ha causado una grave degradación ambiental, con contaminantes de carácter emergente que se hallan en las aguas residuales y superficiales. Como uno de los recursos más importantes para la supervivencia humana, el agua se contamina diariamente con sustancias químicas que alteran el sistema endocrino, incluidos los productos farmacéuticos y de cuidado personal, contaminantes orgánicos y metales pesados. Incluso a bajas concentraciones en cuerpos de agua, la exposición permanente a disruptores endocrinos puede causar efectos adversos en la salud humana y ambiental. La principal preocupación de estos son las enfermedades que pueden generar en los seres humanos o en la vida silvestre al afectar la función de las hormonas en el cuerpo (Kasonga et al., 2020).

Khan et al. (2020) señalan que los compuestos farmacéuticos están siendo considerados como una importante fuente de contaminación para el ambiente. Identificando que este tipo de vertido de efluentes provienen de los hospitales y tiene una eminente cantidad de residuos sintéticos como antibióticos, desinfectantes y otros residuos de tratamientos; los efluentes de este tipo son bioactivos y se ha determinado que su existencia en el ambiente es perjudicial para la vida acuática y para los seres humanos.

Entre este grupo de fármacos; se encuentran los anticonceptivos, los cuales fueron diseñados como un sistema de planificación familiar, están vistos como un factor importante para disminuir el crecimiento insostenible de la población y los efectos negativos que trae consigo a la economía, el medio ambiente y los esfuerzos para alcanzar el desarrollo (Meneses, 2018).

Sin embargo, recientemente ha sido posible determinar sus efectos toxicológicos en el ambiente; debido a que van a parar a las redes de saneamiento, plantas de tratamiento de aguas residuales y finalmente a los cuerpos hídricos (Arbeláez, 2020). Tal y como lo mencionan Spindola et al. (2018) al referir que los estrógenos estrona, 17 $\beta$ -estradiol y

17 $\alpha$ -etinilestradiol, que no son eliminados o degradados completamente por las plantas convencionales de tratamiento de aguas residuales, a menudo son persistentes y se liberan diariamente en cuerpos de agua, que más adelante pueden servir como fuentes de agua potable, generando un problema mucho más álgido. Según el estudio presentado por Grdulska & Kowalik (2020), sobre productos farmacéuticos en agua y aguas residuales: descripción general; mencionan que los fármacos que se identifican con mayor frecuencia en las aguas residuales son las hormonas sexuales (estradiol, éster, etinilestradiol, 17 $\beta$ -estradiol) y fármacos antiepilépticos.

Hom et al. (2019) mencionan que los actuales tratamientos de aguas residuales son ineficientes y limitados para eliminar estos compuestos; representando un grave problema. Sumado a esto la falta de regulación normativa; es por ello, que las hormonas esteroides y sus análogos estructurales constituyen una preocupación ambiental crítica. Estos “estrógenos ambientales” pueden poner en peligro la reproducción y desarrollo de la fauna acuática, incluso a concentraciones muy bajas (nanogramos por litro) (Ayala, 2017).

Los productos farmacéuticos son microcontaminantes que, incluso en dosis bajas, puede inducir efectos fisiológicos en humanos y otros organismos del medio ambiente. Su estructura estable resiste la desintegración y consecuentemente induce a una mayor persistencia en el medio ambiente; por lo tanto, permanece biológicamente activo. Las fuentes principales de estos productos farmacéuticos al medio acuático provienen de los efluentes de las plantas de tratamiento de aguas residuales, aguas de escorrentía provenientes de la agricultura y las tierras de cultivo, y el sorbo de lixiviados de vertedero (Hena et al., 2020).

Con respecto a los residuos farmacéuticos, se ha observado que sólo el 18-32% de los residuos farmacéuticos podrían degradarse mediante tratamiento secundario, presentando un aumento de eliminación entre 30-65% mediante el tratamiento terciario (Khan et al., 2020).

Su presencia en las redes de alcantarillado se debe a los procesos ocurridos después de su ingesta y absorción en el organismo; los fármacos presentan una metabolización para luego ser excretados, lo que lleva a una descarga de complejas mezclas de ingredientes activos y metabolitos (Hom et al, 2019). Por tanto; su uso desenfrenado, aporte continuo

y su nivel de persistencia, están ocasionado diversos efectos no deseados en el ambiente acuático, dentro de los cuales destacan la transmisión de genes de resistencia a antibióticos, daño a las comunidades microbianas, variación en el ritmo de vida y en las relaciones tróficas, descenso en la fertilidad y el cambio en el estado sexual debido a las hormonas (Delgado, 2019). Además de ser responsables de la feminización, el hermafroditismo y reducción de la fertilidad; debido a que son sensibles a los factores de estrés ambiental y pueden desarrollar problemas de salud más adelante en la vida, incluso si el estrés ha cesado (Voisin et al., 2019).

Li et al. (2020) señalan que la contaminación del agua, suelo, sedimentos y otros medios ambientales por estrógenos esteroides es un problema de salud emergente, debido a que los estrógenos exhiben efectos tóxicos en peces y animales, en valores muchas veces por debajo del límite de detección. Es así que Kalyva (2017) señala que en concentraciones de  $\mu\text{gL}^{-1}$  a  $\text{mgL}^{-1}$ , pueden inducir efectos ecológicos adversos, tales como la alteración de las comunidades microbianas, inhibición del crecimiento y la disminución de la actividad microbiana en el suelo (que afectan a las tasas de desnitrificación).

Una de las alternativas para disminuir los impactos negativos que ocasionan estos contaminantes emergentes y en especial el estrógeno sintético, cuyo principio activo es el etinilestradiol, es la implementación de tecnologías de biorremediación (Delgado, 2019). Por tal motivo, nos planteamos la interrogante ¿Cuál es el efecto de la densidad poblacional de *Chlorella sp* en la remoción de etinilestradiol del efluente de la planta de tratamiento de agua residual de Celendín, Cajamarca, Perú, 2021 – 2022?; justificando su valor, en el aporte científico, técnico y teóricos, en la determinación inicial de un contaminante de interés emergente, como lo es el etinilestradiol presente en las aguas residuales, así como su remoción mediada por la microalga *Chlorella sp.*, a través de una metodología que recogió procesos validados anteriormente, los cuales permitieron formular un trabajo en condiciones nuevas y replicables, empleando en el estudio la implementación de fotobiorreactores, cálculos de tiempos de retención acorde con los necesarios para eliminación de este tipo de contaminantes y condiciones que fueron óptimas para el desarrollo y la producción de microalga, justificando el trabajo de investigación, con el objetivo de contribuir con la identificación y generación de una biotecnología que pueda minimizar los impactos ambientales y efectos ecotoxicológicos en los cuerpos receptores y microorganismos que en él se desarrollan.

Por otro lado, ésta investigación justificó su importancia, por ser una alternativa biotecnológica eficiente, ambientalmente amigable, económicamente viable y técnicamente sostenible; aspectos que lo diferencian de los tratamientos físicos y químicos aplicadas a las aguas residuales domésticas convencionales.

Por consiguiente; el objetivo general fue evaluar el efecto de la densidad poblacional de *Chlorella sp* en la remoción de etinilestradiol del efluente de la planta de tratamiento de agua residual de Celendín, Cajamarca, Perú, 2021 – 2022; los objetivos específicos fueron: a) Determinar las concentraciones de etinilestradiol en el efluente de la planta de tratamiento de aguas residuales de Celendín, Cajamarca, Perú, 2021 – 2022; b) Determinar la remoción de etinilestradiol en el sistema de fotobiorreactores de tratamiento y c) Determinar los parámetros fisicoquímicos de temperatura, pH, tiempo de retención hidráulica y oxígeno disuelto en el sistema de fotobiorreactores de tratamiento. Para ello fue necesario la búsqueda y sistematización de información con respecto a la vida media del contaminante, así como de los factores cinéticos del desarrollo y crecimiento óptimo de la microalgas; limitándose a enfatizar los procesos de biorremediación en base a teorías de investigaciones efectuadas con anterioridad, no se realizó análisis de biología molecular o fisiología de la microalgas *Chlorella sp*.

A continuación, se muestra una guía de lectura, que facilita la interacción con la información presentada:

CAPÍTULO I : Presenta de manera objetiva, clara y resumida antecedentes de la problemática, procedimiento general del desarrollo de la investigación, los objetivos que guiaron la investigación, resaltando los alcances y limitaciones de la misma.

CAPÍTULO II : Conformada por el marco teórico, se presenta antecedentes de investigaciones relacionadas, bases teóricas y definiciones básicas para comprender la información científica contenida en la investigación.

CAPÍTULO III : En este capítulo, se describe de manera detallada el proceso realizado en las diversas etapas de la investigación, con la intención de contar con material sólido y de base científica para la réplica de su procedimiento en investigaciones posteriores, misma que resalta el rigor científico que cuenta la investigación desarrollada.

CAPÍTULO IV : Se destaca, por contener información relevante y representativa en relación a los resultados, misma que fue sustentada y discutida con investigaciones anteriores, para darle la validez, garantía y disminución de incertidumbre.

CAPITULO V : Detalla las conclusiones.

CAPITULO VI : Aloja las fuentes y referencias bibliográficas consultadas en el proceso de investigación; mismas que cuentan con el formato APA.

CAPÍTULO VII : Presenta los anexos de la investigación, en este capítulo, se podrá revisar las lecturas de las muestras de laboratorio (Cromatogramas), así como, el detalle estadístico de la investigación y la propuesta técnica de tratamiento con aplicación de microalgas *Chlorella sp.*, para la remoción de etinilestradiol en aguas residuales.

## CAPÍTULO II

### MARCO TEÓRICO

#### 2.1 ANTECEDENTES

En la investigación: “Efectos ecotoxicológicos y eliminación de 17 $\beta$ -estradiol en algas *Chlorella*”, se observó en experimentos de laboratorio, los efectos ecotoxicológicos y los procesos de eliminación de 17 $\beta$ -estradiol en presencia de algas *Chlorella*; utilizando masa de alga seca en suspensión, a una concentración de 0,176 gL<sup>-1</sup> (Aproximadamente 3,75 x 10<sup>7</sup> células), con muestras por triplicado a diferentes concentraciones de 17 $\beta$ -estradiol: 1,0; 0,5 y 0,05 mgL<sup>-1</sup>; en matraces Erlenmeyer de 500 mL; por un período de tiempo de 45 días de tratamiento. Los experimentos dejan suponer que el crecimiento de las algas de *Chlorella* se inhiben a altas concentraciones del contaminante; por ello se recomienda elegir de forma cuidadosa la concentración de E2 para evitar estrés ambiental. Entre sus principales resultados y discusiones se presenta que cuando el pH es igual a 5,0 o 9,0; el crecimiento de *Chlorella* no es el más óptimo; eligiéndose valores óptimos de pH entre 7,0  $\pm$  0,2; con temperatura de 25° C que facilitaron el crecimiento de algas. A concentraciones de contaminante de 0,05 mgL<sup>-1</sup>, se promueve el crecimiento de *Chlorella*, a concentraciones superiores de 1,0 y 2,0 mgL<sup>-1</sup> se muestra una obvia inhibición. Consideran que la eliminación de E2, se debe a los procesos de autotrófia, fijación y transformación de carbono por presencia de microalgas. A concentraciones de 1,0 y 0,5 mgL<sup>-1</sup>, observaron que las eficiencias de remoción por *Chlorella* son de 65% y 92% respectivamente después de 10 días de contacto. Los efectos ecotoxicológicos evidenciados dependen de la concentración de contaminante y del tiempo transcurrido, presentándose pigmentación fotosintética en la *Chlorella* y algunos daños oxidativos (Huang et al., 2019).

Parladé et al. (2018) en su investigación: “Efectos de las condiciones de cultivo sobre la eliminación de  $\beta$ -estradiol en fotobiorreactores de laboratorio y planta piloto por un consorcio de algas y bacterias que trata aguas residuales urbanas” plantearon el objetivo evaluar la capacidad de la biomasa del fotobiorreactor nativo para eliminar el 17  $\beta$ -estradiol en condiciones de interior y exterior, con especies del género *Chlorella*, la pureza del contaminante fue a 98%, utilizándose 4 mgL<sup>-1</sup> en cada fotobiorreactor, los

cuales fueron suministrados en óptimas condiciones para el desarrollo y crecimiento de la microalga; el experimento demostró que la eliminación del contaminante es casi completa a un 93,75%; concluyen, que las poblaciones variadas y distribuidas de manera uniforme estimularon efectivamente las tasas de eliminación; por otro lado señalan que los ensayos de bioaumentación demostraron que el ingreso de biomasa adicional dio como resultado una mayor remoción general, lo cual disminuye el rendimiento por mg de biomasa.

En la investigación: “Eliminación de etinilestradiol de efluentes residuales por mutante de microalgas *Chlorella PY-ZUI* con fijación de CO<sub>2</sub>”; tuvieron como objetivo evaluar la eliminación del disruptor endocrino etinilestradiol (EE2), en agua residual, proveniente de siete depuradoras diferentes, con la aplicación de la mutante de microalga *Chlorella PY-ZUI*, bajo el 15% de CO<sub>2</sub>. La densidad de inoculación fue de 0,4 gL<sup>-1</sup>. Se establecieron tres réplicas para cada condición de cultivo. Concluyendo que se logró la mayor eficiencia de eliminación de EE2 al 94% por *Chlorella PY-ZUI*, en la concentración original de EE2 de 5 mgL<sup>-1</sup>. Además, señalan que los nutrientes y la temperatura, fueron esenciales para el desarrollo de las microalgas. La *Chlorella PY-ZUI* tolera en gran medida el ambiente hostil, siempre que las fuentes de carbono y nitrógeno sean adecuadas; puede crecer bien en los efluentes de la digestión anaerobia y en otras aguas residuales con diferentes concentraciones de EE2. Respecto al control, se evidenció una nula degradación, debido a que no estuvo sometido a ningún tipo de tratamiento (Jun et al., 2017).

Ruksrithong & Phattarapattamawong (2019) en su investigación “Mecanismos de eliminación de estrona y 17β-estradiol por cultivo de microalgas: cinética y eliminación”; tuvieron como objetivo investigar y estudiar cultivos de microalgas para la eliminación de estrógenos, a partir del uso de *Scenedesmus obliquus* y *Chlorella vulgaris*. El experimento de degradación consistió en que cada cepa de microalgas fue individualmente cultivada en un reactor de 5 L. Todos los reactores fueron alimentados diariamente con aguas residuales sintéticas descargadas por la biblioteca de la universidad de Sussex. La concentración inicial de microalgas fue de 100 mgL<sup>-1</sup> peso seco. El pH del medio fue controlado entre 6,8 – 7,0. Ambas concentraciones de estrona y 17β-estradiol fueron 5,0 mgL<sup>-1</sup>. Concluyendo que los cultivos de microalgas de *Scenedesmus obliquus* y *Chlorella vulgaris* en aguas residuales sintéticas, disminuyeron estrona y 17β-estradiol. *Scenedesmus obliquus* eliminó estrona y 17β-estradiol en 91% y 99%, respectivamente.

Mientras tanto, *Chlorella vulgaris* eliminó estrona y 17 $\beta$ -estradiol en un 52% y 99%, respectivamente. El principal mecanismo de eliminación de estrona y 17 $\beta$ -estradiol fue la biodegradación, mientras que la adsorción se consideró minoritaria. Se evidenció que los controles presentaron nula remoción.

En la investigación, denominada: “Eliminación de productos farmacéuticos y de cuidado personal (PPCP) de las aguas residuales utilizando microalgas: una revisión”; en la cual se investigó la capacidad de eliminación de estos contaminantes con la aplicación de especies de microalgas: *Chlorella sp.*, *Chlamydomonas sp.*, y *Mychonastes*; los cuales presentaron porcentajes de remoción en 67 a 97%; asimismo, demostraron que los microcontaminantes eliminados por microalgas en cantidades significativas, se pueden dividir en tres fases: 1) Rápido proceso de adsorción, debido a la interacción fisicoquímica del contaminante en la pared celular., seguido por 2) Transferencia de moléculas a través de la pared celular, de forma lenta., y finalmente 3) Terminado como bioacumulación o ambas (Hena et al., 2020).

Vassalle et al. (2020) en su investigación “¿Se pueden utilizar estanques de algas de alta velocidad como postratamiento de reactores UASB, para eliminar los microcontaminantes?”; evaluaron la capacidad de eliminación de once microcontaminantes (ibuprofeno, diclofenaco, naproxeno, paracetamol, gemfibrozil, estrona (E1), 17 $\beta$ -estradiol (E2), 17 $\alpha$ -etinilestradiol (EE2) y estriol (E3), nonilfenol y bisfenol (A) de agua residual cruda en un sistema de tratamiento UASB-HRAP, combinado con tratamiento aeróbico y anaeróbico a base de microalgas en peso húmedo (*Chlorella vulgaris*, *Scenedesmus sp.*, *Westella botryoides* y especies de diatomeas) operados a 7 y 8 días de retención hidráulica; la configuración experimental consistió en un reactor UASB, seguido de dos HRAP, utilizados como tratamiento posterior del efluente UASB y un sedimentador para separar la biomasa de microalgas de la fase líquida, diseñado para un caudal de 4,5 m<sup>3</sup>, con volúmenes operativos de 205 L. El sistema estuvo con flujo constante y masa algal durante cuatro meses. concluyendo que sólo el estrógeno E2 fue eliminado significativamente a un 85%.

Wang et al. (2019) en su investigación denominada “Biotransformación de estrona, 17 $\beta$ -estradiol y 17 $\alpha$ -etinilestradiol por cuatro especies de microalgas”; investigaron la eliminación de estrona, 17 $\beta$ -estradiol y 17 $\alpha$ -etinilestradiol y productos de transformación de cuatro microalgas comunes: *Haematococcus pluvialis*, *Selenastrum capricornutum*,



*Scenedesmus quadricauda* y *Chlorella vulgaris*. Se encontró que *H. pluviialis*, *S. Capricornioy*, *S. quadricauda* podría eliminar más eficazmente los tres estrógenos del efluente de aguas residuales sintéticas. Los datos obtenidos de la espectrometría de masas identificaron varios metabolitos posibles de escisión del anillo, así como sus rutas metabólicas, que aún no se habían formado, lo que confirma la degradación del estrógeno en lugar de la mera absorción o adsorción por microalgas. Los hallazgos demuestran que no solo algunas bacterias específicas pueden degradar los estrógenos, sino que también las microalgas que viven ampliamente pueden degradar estos contaminantes emergentes, lo que sugiere que las microalgas podrían ser un tratamiento avanzado para eliminar nutrientes y estrógenos en las plantas de tratamiento de aguas residuales.

Hom et al. (2021) en su investigación: “Rendimiento de un fotobiorreactor de microalgas para el tratamiento de aguas residuales de inodoros: Eliminación de compuestos farmacéuticamente activos y recolección de biomasa”, plantearon el objetivo de evaluar el desempeño de un reactor tubular de microalgas para el tratamiento de aguas residuales, en el cual probaron la aplicabilidad del sistema en diferentes períodos y regímenes estacionales para la degradación de compuestos farmacéuticamente activos (PhAC). Además, se evaluó el estudio preliminar de dos técnicas de recolección diferentes para la recuperación de biomasa y la clarificación del sobrenadante. Se utilizó agua residual del drenaje crudo, los cuales fueron colocados en dos cámaras de distribución en cada extremo de los tubos para transferir y distribuir el cultivo de *Chlorella* y obtención de sobrenadante clarificado y recuperado; los resultados obtenidos señalan que existe tasas de remoción de 98% en medicamentos antiinflamatorios, 84% en antibióticos y de 30 a 57% en estrógenos.

## **2.2 BASES TEÓRICAS**

### **2.2.1 Aguas residuales**

Son aquellas provenientes del desarrollo de acciones del ser humano y de los animales, así como las provenientes de las precipitaciones, que son recogidas en los sistemas de alcantarillado o vertidas directamente al ambiente (Lezcano, 2019). Además, se las puede conceptualizar como aguas cuyas propiedades iniciales han sido transformadas por la actividad humana y que debido a su deteriorada calidad demandan de un pretratamiento, antes de volver hacer usadas, transportadas por el sistema de alcantarillado o vertidas a cuerpos naturales (OEFA, 2022).

El Banco Mundial (2020) señala que son aguas residuales y sólidos que de una u otra forma son vertidos al alcantarillado y transportados a través de la red de alcantarillado; también precisa que las aguas servidas domésticas son líquidos resultantes de casas o departamentos, instituciones o centros comerciales e institucionales.

La norma OS.090, como se cita en Quispe y Azabache (2022) precisa a las aguas residuales como aquellas resultantes del uso en una comunidad o industria y que contienen gran cantidad de material orgánico o inorgánico, disuelto o en suspensión.

### **2.2.2 Contaminantes emergentes**

Definidos como subproductos de compuestos químicos cuyas emisiones pueden causar diversos problemas ambientales y de salud; dichos efectos no han sido estudiados ni regulado de una manera suficiente; son considerados como contaminantes no persistentes necesariamente, pero presentan características de gran solubilidad en agua, pudiendo introducirse fácilmente en cualquier fase del ciclo hidrológico (iAgua, 2020).

De Jesús (2020) manifiesta que la concentración de contaminantes emergentes en el ambiente; se debe especialmente por la inadecuada eliminación de las aguas residuales domésticas. La persistencia de estos contaminantes en el ambiente, a pesar de no ser significativa en términos de concentración, simbolizan un potencial riesgo para la salud. Se sabe que pueden generar interferencia en el sistema endocrino y también se sospecha que pueden tener incidencia en otras condiciones como cáncer, problemas de desarrollo neurológico, entre otras. Los contaminantes emergentes se pueden catalogar en dos principales grupos, que son compuestos farmacéuticos, incluido los productos de cuidado personal (PPCP) y los disruptores endocrinos químicos (EDC). Se ha descubierto que el tratamiento de las aguas residuales con sistemas convencionales es ineficaz para eliminar la mayoría de los contaminantes emergentes, por lo que se necesitan tratamientos de tipo avanzados para reducir su concentración en los efluentes de aguas residuales.

La detección de contaminantes emergentes en las condicionantes ambientales fue posible debido al perfeccionamiento y desarrollo de métodos analíticos nuevos y más sensibles; entre los contaminantes emergentes presentes en el agua es necesario enfatizar a los fármacos, compuestos de flúor y carbono (perfluorados), hormonas, drogas y/o sustancias de abuso, productos de higiene y cuidado personal; siendo la fuente de ingreso principal

al ambiente acuático, las aguas residuales, las actividades agrícolas y ganaderas, consideradas como fuentes de contaminación difusa de múltiples pesticidas y antibióticos, comparativamente (iAgua, 2020). A continuación, se presenta la Tabla 1., denominación de grupos, sub grupos y compuestos de interés emergente.

**Tabla 1**

*Contaminantes emergentes, subgrupos y compuestos de interés*

<b>Contaminantes emergentes</b>	<b>Sub grupo</b>	<b>Compuestos</b>
Fármacos	Antibióticos	Lincosamidas, macrólidos, sulfamidas, tetraciclinas, quinolonas
	Analgésicos y antiinflamatorios	Paracetamol, ácido acetil salicílico, ibuprofeno, diclofenaco, meloxicam.
	Psiquiátricos	Benzodiacepinas, barbitúricos
	B-bloqueantes	Metoprolol, propranolol, timolol
	Medios de contraste de rayos X	Iopromide, iopamidol, diatrizoato
	Esteroides y hormonas	Estradiol, estrona, estriol, dietilestilbestrol, etinilestradiol
Productos de tocador	Parabenos	$\alpha$ -olefin sulfonato de sodio
	Filtros solares	Lauril monoetanolamida
	Alquilfenoles	Nonilfenol, octilfenol
<b>Contaminantes emergentes</b>	<b>Sub grupo</b>	<b>Compuestos de interés emergente</b>
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
	Opioides	Heroína, metadona

**Fuente:** Arbeláez (2020).

### 2.2.3 Los fármacos como nuevos contaminantes

Los productos farmacéuticos son de gran importancia para la salud humana y animal. Después de su uso, los agentes activos y sus metabolitos se excretan e impactan en el medio ambiente a través de diferentes vías. Se han encontrado en aguas superficiales, aguas subterráneas, agua potable, sedimentos, lodos de aguas residuales y estiércol;

detectándose un impacto en los organismos vivos. Sus fuentes principales son los vertidos sanitarios y domésticos, los lodos y fugas desde los vertederos. Se evidencia que las plantas de tratamiento de aguas residuales se ven limitadas a degradar eficazmente los productos farmacéuticos, los medicamentos y sus metabolitos modernos y eliminar los microorganismos resistentes a los antibióticos, estos compuestos se encuentran formando parte del efluente de la planta de tratamiento de aguas residuales y/o se absorben en el lodo, se convierten en abono y posteriormente se aplican en la agricultura. Aún existe un desconocimiento sobre las cantidades de productos farmacéuticos que ingresan al medio ambiente, el origen de los agentes activos farmacéuticos, las vías de metabolismo y transformación, los efectos de los principios activos, metabolitos y productos de transformación en los organismos acuáticos, y su persistencia o degradabilidad en el medio ambiente (Mackulak et al., 2019).

Estudios toxicológicos recientes muestran que los fármacos como productos de preocupación emergente, afectan y alteran el comportamiento y estructura de las comunidades acuáticas. Al mismo tiempo, este tipo de contaminantes en las funciones del ecosistema tienen el potencial de influir en la producción de materia orgánica, la absorción de oxígeno y la producción de invertebrados de manera secundaria (Barceló y López, 2022).

En los seres vertebrados e invertebrados, se evidencia la presencia de estrógenos en forma natural, se logró detectar que a concentraciones de estrógenos superiores a los que un organismo produce de manera normal, los seres humanos y formas de vida silvestre pueden verse afectados desfavoreciendo su sistema endocrino. Se supone que los seres humanos se encuentren expuestos a estas elevadas concentraciones de estrógenos, producto de los fármacos utilizados en los tratamientos de procesos como la sustitución hormonal, en la regulación de los ciclos menstruales o el uso de métodos anticonceptivos (Ramírez et al., 2018).

La existencia en el ambiente de estos estrógenos se debe a descargas y/o excreciones provenientes de procesos naturales y/o antropogénicos. De origen natural tenemos, la excreción diaria humana de estradiol, estrona y estriol que varía de hombre (1,6; 3,9 y 1,5  $\mu\text{g}$ ) a mujer (3,5; 3,8 y 4,8  $\mu\text{g}$ ); en mujeres embarazadas diariamente se evidencia una excreción de hasta 6 000  $\mu\text{g}$  de estriol (Petrovic et al., 2021).

#### **2.2.4 Efectos y riesgos ambientales de los fármacos**

Dávila y Ramírez (2019) señalan que los efectos principales en diversos peces, debido a la exposición de diferentes compuestos estrogénicos, son la alteración en el desarrollo sexual, presencia de especies intersexuales (machos que sufren feminización, o hembras que sufren masculinización), cambios del comportamiento en el apareamiento, reducción en el éxito reproductivo y alteración en el sistema endocrino; conduciendo en las especies expuestas a alteraciones en su crecimiento, desarrollo y reproducción; esto debido a que los ríos reciben efluentes domésticos y de plantas de tratamiento de aguas residuales con gran contenido hormonal.

Petrovic et al. (2021) confirman que se ha demostrado la responsabilidad de los estrógenos en la alteración endocrina de ambientes acuáticos; documentando alteraciones como el hermafroditismo en peces, crecimiento deforme de los órganos sexuales en reptiles (lagartos y tortugas), comportamiento de anidación inusual, cutícula de huevos mucho más delgada, y trastornos en el sistema inmunológico y reproductivo de focas grises.

El género sexual está determinado en los peces adultos. Empero, si existe exposición a hormonas, se puede generar cambios en los caracteres sexuales, similar a las típicas de una hembra (Gaitán, 2019).

Asimismo, Gaitán (2019) señala que las raíces de las habas presentan efectos citotóxicos inducido por el estriol, logrando inhibir su división celular. Destaca que el resultado es causado por los estrógenos que tienen la característica de ser intensos cohibidores de la mitosis, por la interacción que presentan en el huso acromático, las proteínas reguladoras y el ADN en esencia.

#### **2.2.5 Microalgas**

Olmedo (2019) “las define como los organismos más simples del reino vegetal, por su gran tolerancia de adaptación a distintos ambientes, lo que ha dado origen a alrededor de 100,000 especies identificadas y distribuidas alrededor del mundo en prácticamente todos los ambientes; señala que se trata de organismos microscópicos, ancestrales, de origen polifilético, es decir que no pertenecen a un solo ancestro común; su tamaño varía entre 20 a 200  $\mu\text{m}$ , son unicelulares y eucariotas, con excepción de las cianobacterias que son procariontes. Su alimentación es esencialmente fotoautótrofa, capaces de utilizar el

carbono inorgánico en forma de dióxido de carbono y la energía de la luz del sol para generar moléculas complejas que le sirvan tanto para la formación de sus estructuras como para la generación y reserva de su energía”.

Asimismo, son consideradas como organismos microscópicos fotosintéticos que se identifican por tener un crecimiento acelerado, las células se duplican de manera exponencial (Santos et al., 2018). “Están compuestas por proteínas, carbohidratos, ácidos nucleicos y ácidos grasos; estos últimos se alojan en las membranas, en los productos de almacenamiento, metabolitos, entre otros; los ácidos grasos representan el 40% de su peso seco” (Tejada et al., 2019).

Algunos estudios señalan que las microalgas pueden tolerar altas concentraciones de disruptores endocrinos; por lo tanto, se les considera como organismos adecuados para procesos de biorremediación (Miazek & Brozek, 2019).

Por otro lado; Kumar et al. (2020) señalan que el uso de microalgas representa un tratamiento eficaz para la biorremediación de los residuos orgánicos; simbolizando una tecnología rentable y sostenible para la economía biocircular si se alimentan de corrientes de desechos de otros subprocesos.

#### - **Microalga *Chlorella sp***

Es un alga verde ovalada que crece como células simples. Perteneciente a la división *Chlorophyta* y a la clase de las *Chlorophyceae*; generalmente es cultivada intensivamente con objetivo alimentario y para obtener metabolitos; los sistemas de lote son los más utilizados a gran escala debido a su bajo riesgo de contaminación y cómoda implementación (Infante et al., 2022).

Algunas referencias, señalan que las células también se presentan de manera esféricas, ovoides o elipsoidales, solitarias o formando colonias de hasta 64 células. El cloroplasto tiene forma de plato o copa, con o sin pirenoides, rodeado de granos de almidón, con ausencia de flagelos, con presencia o ausencia de mucílagos (Guamán y González, 2019).

*Chlorella sp*, es considerada como un alga unicelular, de forma esférica, presenta un diámetro entre cien y mil veces menor a 1 mm, tiene color verde obtenida de los cloroplastos, mismos que se encargan de realizar el proceso fotosintético, es por esta

característica que recibe el nombre *Chlorella* al género, que significa pequeño verde (CEIBAL, 2019).

Su reproducción es mediada por la liberación de autoesporas mediante la ruptura de la pared celular de la madre. La célula hija permanece fusionada a la pared celular restante de la madre, formando nuevas colonias con recubrimiento mucilaginoso (Guamán y González, 2019).

Las microalgas de género *Chlorella* son importantes dentro de los aspectos comerciales por su fácil cultivo y alto valor nutricional (López et al., 2021). Se han utilizado para diversos propósitos en industrias cosmetológicas, farmacéuticas, alimentarias, agricultura, hasta en tratamiento de aguas residuales. Asimismo, en la producción de distintos tintes y como una opción alimenticia para el hombre y curtiembre de animales (Urbano, 2019).

#### **2.2.6 Parámetros de cultivo en microalgas**

Los cultivos a escala de laboratorio con frecuencia suelen ser monoalgales y no siempre axénicos; a diferencia de los cultivos en placa. En relación a lo señalado, se puede inferir; que se puede cultivar una sola especie de microalga, pero estará acompañada de una diversidad de microorganismos como bacterias; esto no representa algo negativo, sino por el contrario deseable; debido a que la coexistencia de organismos hace factible los procesos de degradación o eliminación de contaminantes (Fernández, 2020).

Como señala Salgueiro (2018), los parámetros requeridos de forma fundamental para el cultivo óptimo de las microalgas están dadas por:

##### **- Temperatura**

Durante el cultivo de microalgas, la temperatura es un factor importante que requiere un control constante, ya que afecta la composición bioquímica de las células y a la cantidad de lípidos. Para lograr una alta tasa de crecimiento, es fundamental crear una zona con temperatura óptima entre 16 y 27 °C; teniendo en cuenta, que por encima o por debajo de la temperatura óptima, no sería posible su crecimiento, debido a que podrían manifestarse daños irreversibles en algunas proteínas. La producción de algas aumenta en relación a la temperatura hasta alcanzar la óptima de cada especie; por encima de eso, aumenta la

respiración y la fotorrespiración reduce la productividad total; la temperatura óptima varía de una especie a otra, pero suele estar entre 28 y 35°C en general (Park et al., 2019).

#### - **Iluminación**

El crecimiento de las microalgas, están dadas por dos características de la iluminación (Intensidad y fotoperiodo), entendiéndose como intensidad lumínica al flujo de luz por unidad de área y al fotoperiodo como la relación entre las horas de luz y de oscuridad. Las microalgas solo usan la luz de un determinado intervalo conocido como radiación fotosintética activa (PAR), que representa una longitud de onda entre 300 y 700 nm, lo que vendría a ser el 40% de la radiación total del sol para realizar la fotosíntesis. La intensidad de la luz, juega un papel importante en el proceso de crecimiento para los microorganismos. En el caso de la *Chlorella*, el periodo de horas luz y oscuridad que se suelen usar son fases que van desde 12:12 hasta 18:6, con valores de irradiación artificial de 14:10 (Bhola et al., 2020).

#### - **pH**

Varias investigaciones como la de Martínez (2018), Park et al. (2019) señalan que “el pH del medio de cultivo simboliza un parámetro propio en cada especie de microalga, con una influencia directa e importante en su metabolismo. Generalmente en los cultivos, el valor de pH levemente se encuentra por encima de la neutralidad; en cuyo caso, estos microorganismos se llaman neutrófilos; sin embargo, en determinados casos, como en sistemas de cultivo cerrados, este factor, debido al consumo de CO<sub>2</sub> y nutrientes que presentan una tendencia variable; en dichas circunstancias, y para corregirlo, ya que valores de pH altos inhiben el crecimiento celular, se emplea disoluciones tampón como puede ser la de fosfatos, que funcionan en el rango de valores de pH próximos a 7,0. El pH del cultivo se ve influenciado por diferentes factores como la producción de algas, la respiración, la alcalinidad y composición iónica del medio de cultivo, la actividad microbiana autotrófica y heterotrófica y la eficiencia del sistema de adición de CO<sub>2</sub>”.

#### - **Agitación**

Para una correcta distribución de las microalgas, se debe mantener una adecuada aireación y agitación, mismas que impidan la sedimentación o adherencia a las paredes del reactor. Al mismo tiempo, la agitación permite la homogeneización del pH y nutrientes, descartando variaciones de temperatura, además de facilitar una adecuada exposición a la



fuente de luz, teniendo en cuenta, que conforme pasa el tiempo, el cultivo se vuelve más denso. A pesar de ello, es necesario tener en consideración que el grado de agitación está significativamente relacionada con la producción de las microalgas (Robles et al., 2019).

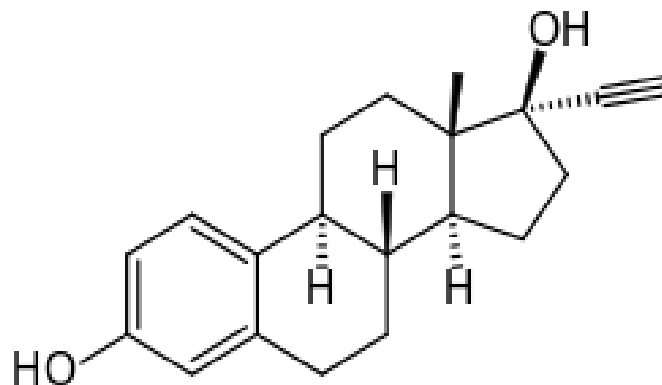
Suh & Lee (2022) señalan que la agitación de manera excesiva, ya sea con el empleo de agitadores o por burbujeo, generaría un estrés hidrodinámico, lo que conlleva a una gran reducción en la tasa de crecimiento de las microalgas.

### 2.2.7 Etinilestradiol

El  $17\alpha$  - etinilestradiol (EE2) es considerado un análogo estructural del estrógeno natural  $17\beta$  - estradiol (E2). El etinilestradiol (Figura 1), es el principio activo de los anticonceptivos, que se excreta en grandes cantidades a través de la orina y heces de las mujeres, no es tratada de manera adecuada en las plantas de tratamiento de aguas residuales convencionales; por tanto, pasan fácilmente al medio acuático y por consiguiente a organismos vivos que en el habitan (García, 2019).

#### Figura 1

*Estructura molecular del etinilestradiol*



Fuente: (García, 2019).

Tal y como se presenta en la Tabla 2., el etinilestradiol presenta características farmacocinéticas, por la cual pasa por un proceso de absorción en el intestino delgado, alcanzando un pico en el plasma sanguíneo después de dos horas; de manera posterior se da un proceso metabólico en el hígado, el cual se asocia a la enzima citocromo. Finalmente, los metabolitos se excretan en heces y orina en forma de conjugados de

glucorónido y sulfatos. Debido a la circulación enterohepática, pasada algunas horas se produce un segundo pico de concentración sanguínea, siendo aquí donde el etinilestradiol se une casi por completo a la albúmina (Djerassi, 2022).

**Tabla 2**

*Características del etinilestradiol*

<b>Etinilestradiol</b>	
<b>Nombre IUPAC:</b> (8 R, 9 S, 13 S, 14 S, 17 R) -17-etinil-13-metil 7,8,9,11,12,14,15,16-octahidro- 6H- ciclopenta [a] fenantreno-3,17-diol.	
<b>Identificación</b>	
Número CAS	57-63-6
Código ATC	G03CA01
<b>Datos químicos</b>	
Fórmula	C <sub>20</sub> H <sub>24</sub> O <sub>2</sub>
Peso molecular	296,41 g mol <sup>-1</sup>
<b>Farmacocinética</b>	
Disponibilidad biológica	51 ± 9%
Unión a la proteína	97%
Proceso metabólico	Hepático
Duración (Vida media)	36 ± 13 h
Vía de excreción	Heces: 62% Orina: 38%
<b>Datos clínicos</b>	
Vía de administración	Oral y subdérmica

Fuente: Pubchem (2019)

El etinilestradiol fue desarrollado en la década de 1930 y se introdujo en la medicina en 1943. Este medicamento fue utilizado por primera vez en 1960 como píldora anticonceptiva. Hoy en día, es considerado el estrógeno más utilizado, debido a que se puede encontrar en una diversidad de tipos combinados en las píldoras anticonceptivas (Evans, 2021).

Johnson y Chen (2020) indican que las mujeres pueden excretar diariamente 35 µg de etinilestradiol ya sea por vía fecal o urinaria, debido al uso de anticonceptivos.

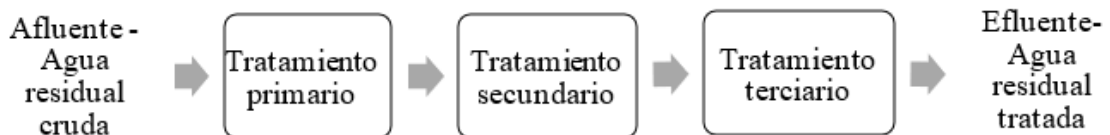
### 2.2.8 Tratamiento de aguas residuales

Lezcano (2019) indica que se trata de procesos que tienen por objeto reducir y/o eliminar cargas orgánicas adyacentes de actividades domésticas o industriales, relacionadas con la

Demanda Bioquímica de Oxígeno (DBO<sub>5</sub>), Demanda Química de Oxígeno (DQO), nutrientes como el Nitrógeno y el Fósforo, organismos patógenos, incluyendo las formas parasitarias (huevos de helmintos, quistes de protozoarios, entre otros; a fin de evitar la infiltración en el subsuelo que contamine las aguas subterráneas o evitar el crecimiento acelerado de las algas que podrían ocasionar problemas de eutrofización en las aguas receptoras, así como cumplir con las normas o reglamentos legales que permiten el vertimientos a la red de alcantarillado de aquellas aguas residuales no domésticas, vertimientos a las fuentes de agua y el uso de las aguas residuales. En general las aguas residuales, pasan por procesos de tratamiento secuenciales en los cuales cada etapa es determinante para la calidad del efluente vertido (tal como se muestra en la Figura 2).

## Figura 2

### *Tratamiento de aguas residuales*



**Fuente:** (Banco Mundial, 2020).

Pérez y Camacho (2021) señalan que estos procesos están referidos a siguiente:

- Tratamiento primario: Eliminación de sólidos flotantes y sedimentables, a través de procesos de sedimentación.
- Tratamiento secundario: Procesos biológicos para eliminación y reducción de la materia orgánica disuelta a partir de la digestión medida por bacterias aerobias.
- Tratamiento terciario: Procesos de carácter fisicoquímico para reducir la carga contaminante de aguas residuales, por procesos de desinfección o filtración.

### **2.2.9 Aplicación de microalgas en tratamiento de aguas residuales**

La aplicación de microalgas, representa una alternativa viable en el tratamiento de las aguas residuales, incrementando la sostenibilidad en los procesos de remoción de contaminantes en cuerpos hídricos alterados; debido a que, forma parte fundamental para devolver el agua utilizada por los humanos al medio ambiente de manera aceptable y

continuar el ciclo hidrológico; siendo una de las técnicas utilizadas en los procesos de remediación biológica, pudiendo ser biorremediación, fitorremediación y rizorremediación, empleando microalgas; estas microalgas son muy útiles en el tratamiento de aguas residuales, especialmente porque su capacidad de eliminar nutrientes y xenobióticos, a partir del uso de especies como *Scenedesmus quadricauda*, *Chlorella miniata*, *Chlorella vulgaris* y *Chlorella sorokoriana*, especies que inciden en la eliminación de manera eficiente de contaminantes; presentando eficiencias mayores a 95% en fármacos (Candela, 2018).

El uso de microalgas para el tratamiento de aguas residuales se inició en la década de 1960, pero aún no ha sido posible introducirlo como sistema a escala industrial, debido a ciertas limitaciones que impiden alcanzar la eficiencia de los sistemas de tratamiento convencionales. La implementación de las microalgas no se puede plantear de manera independiente, pero si como un paso incluido en el sistema de tratamiento de la planta de tratamiento de aguas residuales, generalmente como tratamiento secundario o terciario para cumplir con los límites de descarga y como un medio para eliminar nuevos contaminantes. Se puede cultivar en aguas residuales, en base a la similitud entre la composición de las aguas residuales y los nutrientes esenciales para el crecimiento de las microalgas, principalmente carbono, nitrógeno y fósforo (Gómez et al., 2021).

El uso de microalgas elimina de manera eficiente la mayoría de los productos farmacéuticos, con tasas de eliminación de 40-60%, que surgen de procesos como bioadsorción y bioacumulación a la biomasa de microalgas, representando una buena tecnología verde, de bajo costo y más sostenible (García et al., 2020).

Por último, es necesario destacar lo mencionado por Shahid et al. (2020) “La aplicación de microalgas en el tratamiento de aguas residuales (fitoremediación) ofrece varias ventajas sobre los métodos de tratamiento basados en productos químicos. Cultivarlas en aguas residuales permite una elevada tasa de fijación de carbono atmosférico (1,83 kg CO<sub>2</sub> biomasa<sup>-1</sup>) incrementando su productividad de biomasa de manera acelerada (40-50% más elevada que los cultivos terrestres) entre todos los biorremediadores terrestres con la eliminación de contaminantes concomitantes (80-100%). Además, la biomasa de algas puede contener metabolitos de alto valor, incluidos ácidos grasos omega-3, pigmentos, aminoácidos y alto contenido de azúcar. Por lo tanto, después de la extracción de compuestos de alto valor, la biomasa residual puede convertirse directamente en

energía mediante transformación termoquímica o puede utilizarse para producir biocombustibles mediante fermentación biológica o transesterificación”.

#### **2.2.10 Mecanismos para la eliminación de etinilestradiol**

Yien et al. (2019) mencionan que los estrógenos esteroides como el etinilestradiol no se eliminan por completo durante el proceso de depuración en las plantas de tratamiento de aguas residuales; siendo este el motivo de estar clasificados en la lista de vigilancia en la normativa europea, debido a sus posibles riesgos para el medio acuático.

Siendo los procesos de adsorción/absorción y biodegradación los principales mecanismos de eliminación de etinilestradiol; estos procesos obedecen a la característica del compuesto químico, como a su hidrofobicidad y grupo funcional disponible; además de la especie de microalga en uso, que ejercerá el papel de adsorbente o absorbente; es necesario destacar las condiciones ambientales (ph, oxígeno disuelto y temperatura) (Norvill et al., 2019).

Neilson & Lewin (2020) señalan que los procesos de adsorción parecen denotar un proceso previo en la biodegradación de ciertos contaminante; por otro lado, la degradación biológica del etinilestradiol aplicando microalgas *Chlorella*, tienen lugar de manera directa gracias a la presencia de metabolitos heterótrofos; o mediante la acción de enzimas extracelulares. Muñoz y Guleysse (2018) señala que de manera indirecta el incremento del oxígeno disuelto en el agua, favorece la degradación de los contaminantes, debido a procesos de fotosíntesis mediante cambios de pH, o en la correspondencia simbiótica establecida entre las bacterias.

## **2.3 DEFINICIÓN DE TÉRMINOS BÁSICOS**

### **2.3.1 Disruptores endocrinos**

Son sustancias químicas exógenas; mezcla de sustancias químicas o factores exógenos no químicos que interfieren con el sistema endocrino normal del cuerpo, lo que produce efectos adversos sobre las funciones hormonalmente controladas, son heterogéneos y varían desde químicos sintéticos hasta químicos naturales; los productos químicos sintéticos como los bifenilos policlorados, plastificantes, pesticidas, fungicidas y agentes farmacéuticos son conocidos actualmente; debido a que provocan alteraciones en los sistemas hormonales y homeostáticos e interfieren con la capacidad del cuerpo para comunicarse y responder al medio ambiente (Ratán, 2019).

Son un grupo de compuestos con actividades estrogénicas, se han encontrado en aguas residuales, actualmente llaman la atención debido a los impactos producidos a la salud en la vida de microorganismos (Hom et al., 2019). Causan alteraciones morfológicas, reducción de la fertilidad, interferencia en la diferenciación sexual, mejorando el crecimiento de células de cáncer de mama humano y acción mutagénica en células humanas (Gattullo et al., 2022).

### **2.3.2 Biotransformación**

La biotransformación implica la conversión a compuestos más solubles en agua que pueden excretarse como productos de reacciones bioquímicas; por lo general, las reacciones de biotransformación producen metabolitos inactivos, más polares, solubles en agua para su eliminación; sin embargo, en algunos casos se producen metabolitos con mayor actividad biológica que son más reactivos y por tanto tóxicos; el cuerpo está expuesto a todo tipo de sustancias químicas xenóforas que, al ser absorbidas, se acumularán en él y amenazarán su equilibrio funcional. Una concentración demasiado alta de cualquier xenobiótico en el cuerpo amenaza inevitablemente la actividad de las biomoléculas que funcionan en su entorno y pueden cambiar el funcionamiento normal de un órgano, tejido o sistema (Tejedor, 2021).

Por su parte Le (2019) señala que es el proceso de modificación estructural de los productos farmacéuticos después de que ingresan al cuerpo; generalmente ocurre en el hígado como resultado de procesos de oxidación (más a menudo), reducción, hidrólisis y

conjugación; la biotransformación da como resultado la formación de metabolitos inactivos, algunos de los cuales pueden diferir de los fármacos originales con la misma o diferente actividad farmacológica; la biotransformación puede alterarse induciendo o inhibiendo enzimas.

### **2.3.3 Metabolitos**

Se denomina a aquella sustancia o subproducto resultante del proceso del metabolismo; además puede referirse a los productos que quedan posterior a la desintegración de un producto farmacéutico en interacción de un cuerpo (Kumar et al., 2019).

Por lo general, cuando los fármacos se metabolizan, se vuelven inactivos, pero en algunos casos, los metabolitos pueden volverse farmacológicamente activos y afectar el cuerpo; de hecho, los metabolitos activos de algunos fármacos son los responsables de la acción primaria del fármaco, conocidos como profármacos (Checa, 2017).

### **2.3.4 Fármacos**

Un fármaco se define como cualquier sustancia (diferente a un dispositivo o un alimento) utilizado en el análisis, el tratamiento, la cura o la prevención de una enfermedad, o para tratar padecimientos que impliquen modificación y/o alteración en la estructura o el funcionamiento del organismo. Los anticonceptivos orales son un ejemplo de medicamentos que afectan las funciones corporales en lugar de los procesos de mejora en una enfermedad. Su uso diario es bastante complicado desde el punto de vista legal; una definición más simple se referiría a una droga como cualquier producto químico o biológico que afecta el cuerpo y sus funciones (Lynch, 2019).

Podemos encontrar definiciones que refieren a los fármacos como productos con estructura química conocida puntualmente y que es capaz de originar efectos o cambios sobre una propiedad fisiológica puntual (ASHP, 2017).

### **2.3.5 Hidrofobicidad**

Este parámetro caracteriza el grado de similitud de la molécula en la fase lipídica y simultáneamente mide la repulsión de la molécula a las soluciones acuosas; la permeabilidad depende de la hidrofobicidad por la que tiene que pasar la solución del fármaco, donde hay un espacio entre la solución acuosa y el fármaco, debido a la ruptura del enlace de hidrogeno (Azcárte, 2018).

### **2.3.6 Adsorción**

La adsorción es un proceso que representa la interrelación entre dos fases distintas que forman una capa de interfaz, transfiriendo moléculas de un fluido a granel (líquido o gas) a una superficie sólida y; por lo tanto, se clasifica como un proceso de superficie. Esta capa está representada por dos tipos de interacciones físicas o químicas. Este proceso suele ser reversible y el proceso inverso se llama desorción (Marwa, 2021).

### **2.3.7 Absorción**

Le (2019) señala que la absorción del fármaco depende de sus propiedades fisicoquímicas, composición y forma de administración; las formas de dosificación (en concreto: tabletas, cápsulas, soluciones) consisten en fármacos y otros ingredientes y están diseñadas para la administración por varias vías (oral, bucal, sublingual, rectal, parenteral, tópica, inhalación). Independientemente de la vía de administración, los medicamentos deben disolverse para ser absorbidos, por lo que la forma sólida (tableta) debe poder disolverse y desintegrarse.

### **2.3.8 Hormonas**

Las hormonas son mensajeros químicos que afectan y manejan cientos de procesos corporales. A menudo, un proceso corporal implica una reacción en cadena de varias hormonas diferentes. Una hormona solo actuará en una parte del cuerpo si "encaja", si las células en el tejido objetivo tienen receptores que reciben el mensaje de la hormona. Pensemos en una hormona como una llave y en las células de su tejido objetivo, como un órgano o tejido adiposo, como cerraduras de forma especial. Si la hormona encaja en la cerradura (receptor) de la pared celular, entonces funcionará; la hormona entregará un mensaje que hará que el sitio objetivo realice una acción específica (Barrington, 2022).

### **2.3.9 Estrógenos**

García (2019) señala que los estrógenos son considerados esteroides, usados para regular diferentes aspectos reproductivos; sin embargo, toman un papel fundamental en el sistema inmunológico; actuando por medio de los receptores clásicos de estrógenos nucleares y de la membrana receptora asociado a la proteína G.



### **2.3.10 Anticonceptivos**

Son métodos y técnicas de control de la natalidad (Fernández et al., 2021). Por su parte Álvarez (2020) menciona que los anticonceptivos hormonales se encuentran constituidos por dos hormonas sexuales, estrógeno y progesterona, y se pueden administrar de diversas formas, como por vía oral, subcutánea e intramuscular.

## CAPÍTULO III

### MATERIALES Y MÉTODOS

#### 3.1. UBICACIÓN

La investigación se desarrolló en diferentes lugares, debido a que el trabajo se llevó en tres etapas diferenciadas. La etapa previa: Recolección del agua residual de la Planta de Tratamiento de Aguas Residuales de Celendín, ciudad Celendín; escalonamiento de las microalgas *Chlorella sp.* y filtrado al vacío del agua residual en el laboratorio de aguas de la Universidad Nacional Autónoma de Chota e instalación del experimento en un área acondicionada, ubicada en la Av. La Cantuta S/N, de la ciudad de Cajamarca (Según se muestra en la figura 3), a los 2 683 m.s.n.m., en las coordenadas 9208343,65 N y 775899,63 E. La etapa de laboratorio: Análisis de detección y remoción del etinilestradiol en la Universidad Peruana Cayetano Heredia en su laboratorio de bioquímica de la ciudad de Lima.

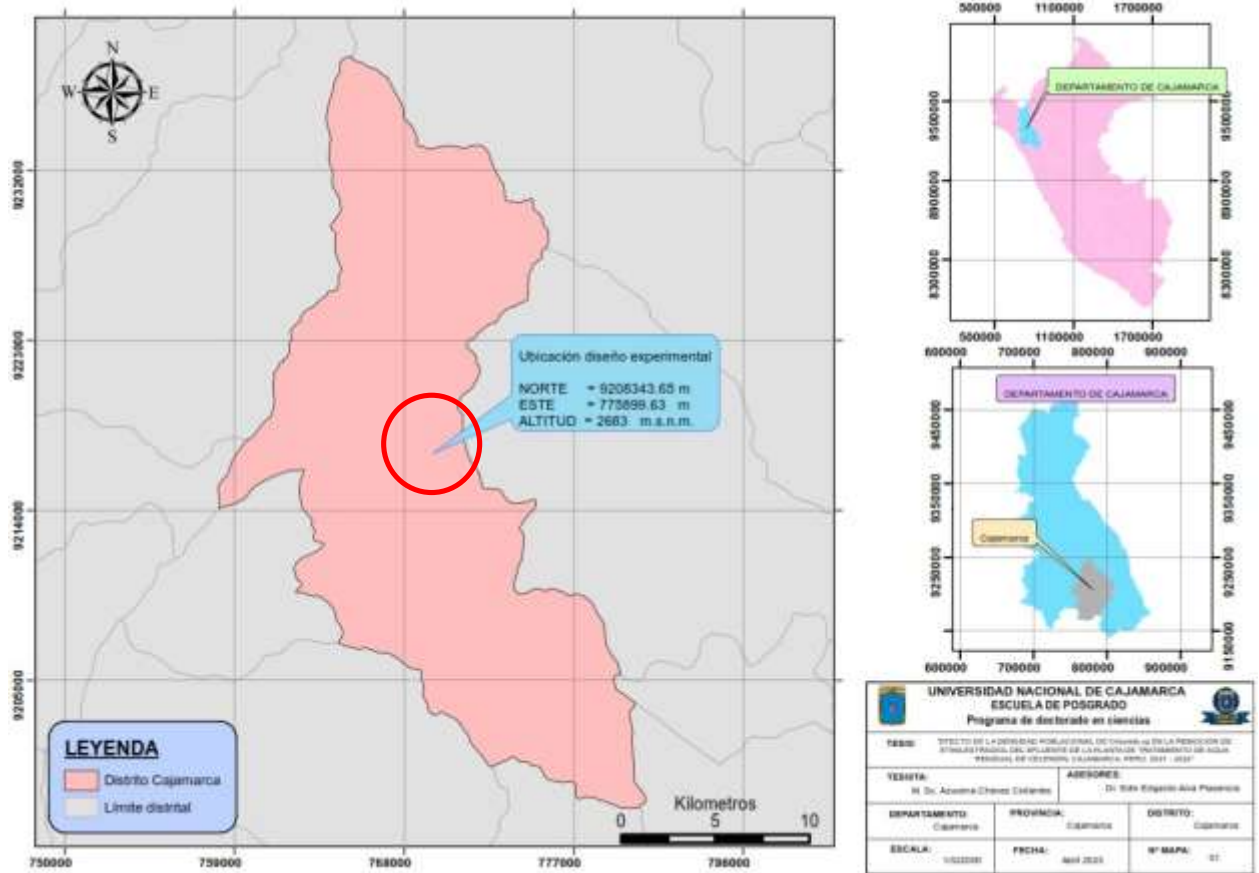
Las condiciones ambientales del área adecuada en la Av. La Cantuta S/N, de la ciudad de Cajamarca; fueron las siguientes:

Temperatura ambiental: 21.5 °C. ± 0.5

Humedad: 82%.

**Figura 3**

*Ubicación de la instalación del proyecto de investigación*



*Fuente: Adaptado de Google maps (2021).*

## 3.2. MATERIALES

### 3.2.1. Materiales de campo

- Probetas graduadas de PVC, semi 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 watts marca: Philips modelo: Súper 80 36W/865 G13
- Fichas de campo.
- Termómetro ambiental de mercurio.
- Balde de 5 litros.

- Mandil blanco.
- Mascarillas y guantes quirúrgicos.

### **3.2.2. Materiales e insumos de laboratorio**

- Agua residual de la PTAR – Celendín.
- 17 $\alpha$ -Ethinylestradiol, 98% de pureza, lote #. WXBC9894V, SIGMA-ALDRICH.
- Microalgas *Chlorella sp* (CEPA UTEX 2714)
- Balanza analítica Marca: Ohaus Modelo: Adventurer AX324.
- Centrifuga Marca: Biobase Modelo: BK-THR20K-D.
- Microscopio óptico, marca: Olympus, modelo: CX23.
- Equipo de filtración al vacío.
- Cámara de Neubauer de dos rejillas.
- Azul tripán.
- PHmetro digital, marca: Hanna Instrument, modelo: pH&ECHI98129 y HI98130.
- Matraz Erlenmeyer 1000 mL.
- Frasco Winkler de 250 mL.
- Vasos de precipitado.
- Algodón y papel aluminio.
- F/2 Guillard's Algae Food – Part A y Part B.
- Jeringas de 10 mL.
- Filtros para jeringa SIMPLEPURE PES 0,54  $\mu$ m.
- Filtros Milipore (tamaño del poro de 0,54  $\mu$ m).
- Tubo para centrifuga de propileno, base cónica, tapa rosca, 15 mL.
- Metanol, Acetonitrilo y Ácido fosfórico.
- Agua destilada (Filtrada).
- Cromatógrafo líquido de alta densidad

### **3.2.2. Materiales de gabinete**

- GPS, marca: GARMIN, modelo: GPSmap76CSx.
- Laptop, marca Lenovo, procesador Intel Core i7; para ordenar, clasificar y procesar la información.
- Software IBM SPSS ®
- Microsoft Word 2016, Microsoft Excel 2016.
- Cámara digital, marca Canon T100, modelo CAM EOS REBEL T100, de 18 MP.

- Útiles de escritorio.
- Impresora multifuncional, marca Epson, modelo L3210 - Ecotank

### 3.3. METODOLOGÍA

La investigación tuvo un diseño de tipo experimental, por su finalidad fue aplicada, de temporalidad longitudinal (diacrónica), mixta por el enfoque teórico metodológico y de intervención multidisciplinaria (Hernández, 2014). Asimismo, según el grado de manipulación de la variable independiente, la investigación tuvo un nivel de presencia o ausencia; el cual implicó que un grupo se expuso a la presencia de la variable independiente y el otro no. De manera posterior, ambos grupos se compararon para conocer si el grupo expuesto a la variable independiente es diferente del grupo que no fue expuesto.

El experimento consistió de tres tratamientos, con tres repeticiones, más dos testigos; según se detalla en la Tabla 3, dispuestos de manera randomizada (Figura 4).

**Tabla 3**

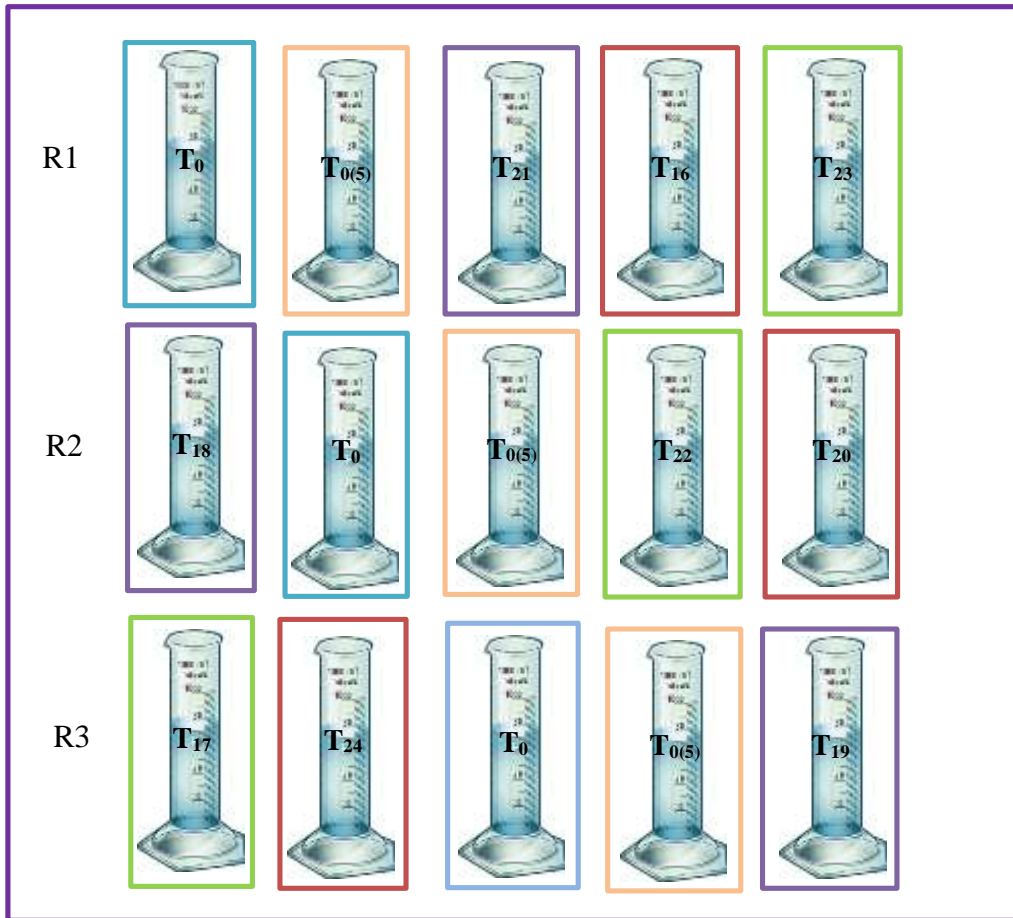
*Tratamientos en estudio*

N°	Clave	Descripción	Etinilestradiol (mgL <sup>-1</sup> )
1	T <sub>0</sub>	Agua residual	4
2	T <sub>0(5)</sub>	Agua residual	4
3	T <sub>21R1</sub>	Agua residual + 100 mL L <sup>-1</sup> de biomasa fresca de <i>Chlorella sp</i>	4
4	T <sub>18R2</sub>	Agua residual + 100 mL L <sup>-1</sup> de biomasa fresca de <i>Chlorella sp</i>	4
N°	Clave	Descripción	Etinilestradiol (mgL <sup>-1</sup> )
5	T <sub>19R3</sub>	Agua residual + 100 mL L <sup>-1</sup> de biomasa fresca de <i>Chlorella sp</i>	4
6	T <sub>16R1</sub>	Agua residual + 200 mL L <sup>-1</sup> de biomasa fresca de <i>Chlorella sp</i>	4
7	T <sub>20R2</sub>	Agua residual + 200 mL L <sup>-1</sup> de biomasa fresca de <i>Chlorella sp</i>	4
8	T <sub>24R3</sub>	Agua residual + 200 mL L <sup>-1</sup> de biomasa fresca de <i>Chlorella sp</i>	4
9	T <sub>23R1</sub>	Agua residual + 300 mL L <sup>-1</sup> de biomasa fresca de <i>Chlorella sp</i>	4
10	T <sub>22R2</sub>	Agua residual + 300 mL L <sup>-1</sup> de biomasa fresca de <i>Chlorella sp</i>	4
11	T <sub>17R3</sub>	Agua residual + 300 mL L <sup>-1</sup> de biomasa fresca de <i>Chlorella sp</i>	4

*Nota:* Concentración de microalgas y etinilestradiol para el experimento.

**Figura 4**

*Distribución del sistema de fotobiorreactores*



*Nota:* Codificación de tratamientos.

Se trabajó tres etapas: una etapa previa y/o campo, laboratorio y gabinete; las cuales se detallan a continuación:

### 3.3.1. Etapa previa y/o campo

#### a) Escalamiento de microalgas *Chlorella sp*

En esta primera etapa se desarrolló el cultivo, escalamiento, mantenimiento y aclimatación de las cepas de microalgas *Chlorella sp*. Para asegurar la calidad e inocuidad, se adquirió 1 L de cultivo de *Chlorella sp*., CEPA UTEX 2714 de la Universidad Nacional del Santa certificada por el Blgo. Gustavo Olivos Ramírez; el cultivo inicial tuvo una densidad poblacional de  $2 \times 10^6$  células mL<sup>-1</sup> de *Chlorella sp*.

- Se efectuó el cultivo y desarrolló el escalamiento de *Chlorella sp*., a través de técnicas de aislamiento y purificación; se realizó el mantenimiento y aclimatación del cultivo a las condiciones ambientales de laboratorio de la Universidad Nacional

Autónoma de Chota; para posteriormente ser transportados e implementados en los respectivos sistemas de fotobiorreactores blanco y tratamientos.

- El litro de cultivo inicial de *Chlorella sp.*, fue separado en 5 cantidades iguales de 200 mL aforados a 500 mL con agua potable en matraces Erlenmeyer. El cultivo alcanzó la densidad de  $2,1 \times 10^6$  células mL<sup>-1</sup> de *Chlorella sp.* a los 15 días, teniendo en cuenta su crecimiento exponencial, repitiéndose el proceso hasta obtener 2 L.
- A cada matraz Erlenmeyer, se le 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 2/1000 mL de cada complemento nutricional (Como se evidencia en la Tabla 4).

**Tabla 4**

*Composición nutricional F/2 Guillard's*

Composición F/2 Guillard's Algae Food – P. A	Composición F/2 Guillard's Algae Food – P. B
Ferric Chloride (Fe) 0,82%, Colbalt 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.	Sodium Nitrate (N) 9,33%, Monosodium Phosphate (P205) 2,0%; Thlamine Hydrochloride (B1) 0,07%; Vitamin B12 0,0002% y Biotin 0,0002%.

Fuente: Montoya y Acosta (2021)

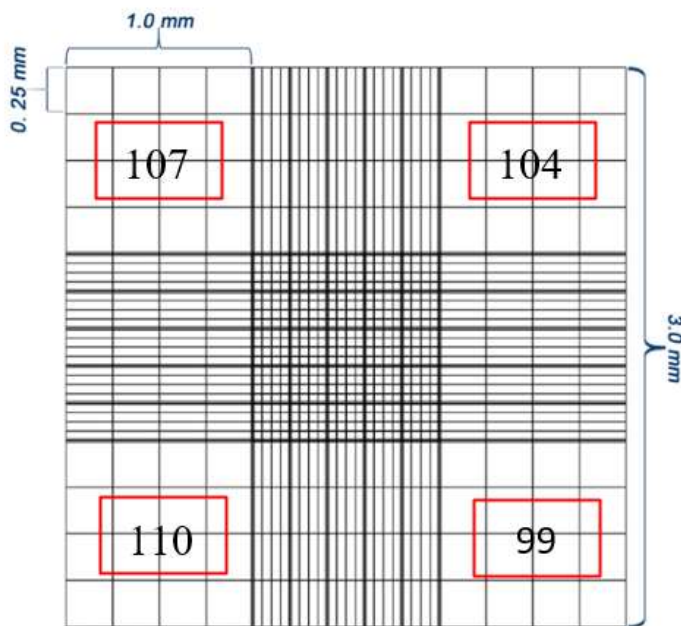
- Los cultivos se mantuvieron a condiciones de laboratorio a una temperatura de 21,40 °C promedio, luminosidad con luz blanca fluorescente de 36 Wattss e intensidad de 2000 lux, el pH oscilo entre 7,03 promedio y agitación a través de la inyección de aire, por bombas de aireación.
- Se realizó monitoreos del crecimiento y adaptabilidad, verificando y regulando las condiciones de luminosidad, aireación y temperatura para asegurar un cultivo con condiciones óptimas y homogéneas.
- Se procedió de manera constante a realizar acciones de control de algún tipo de contaminación de los cultivos, no registrándose caso alguno; debido a la inocuidad del cultivo inicial adquirido. El recuento se hizo en el laboratorio de aguas de la Universidad Nacional Autónoma de Chota, el procedimiento fue el siguiente:
  - Se añadió tripsina al cultivo; para generar un desprendimiento de las células que están desarrolladas en el cultivo, con diferentes mecanismos enzimáticos,

mecánicos y químicos separamos las células de forma individual (A este procedimiento se le conoce como “Tripsinización”).

- Adición de solución de azul tripán: para visualizar y diferenciar las celas vivas y células muertas (Debido a las rupturas en la membrana de la célula muertas, ingresa la solución al interior de ellas).
- Se realizó el conteo haciendo uso de la cámara de Neubauer de dos rejillas, profundidad 0,100 mm y área de cuadrante 0,0025mm<sup>2</sup>.
- Se adicionó 10 µL de suspensión celular en cada rejilla de la cámara, para posteriormente realizar el conteo en los cuatro cuadrantes extremos de la rejilla, tal como se muestra en la Figura 5.

**Figura 5**

*Conteo en cuadrantes extremos, haciendo uso de la cámara de Neubauer*



$$\begin{aligned}
 &= \frac{N \text{ células}}{\# \text{ cuadros grandes}} \times \frac{1 \text{ cuadro}}{L \times A \times P \text{ mm}^3} \times \frac{1000 \text{ mm}^3}{1 \text{ cm}^3} \times \frac{1 \text{ cm}^3}{1 \text{ mL}} \times FD \\
 &= \frac{420 \text{ células}}{4 \text{ cuadros grandes}} \times \frac{1 \text{ cuadro}}{1 \times 1 \times 0,1 \text{ mm}^3} \times \frac{1000 \text{ mm}^3}{1 \text{ cm}^3} \times \frac{1 \text{ cm}^3}{1 \text{ mL}} \times 2 \\
 &= 210000 \frac{\text{células}}{\text{mL}} \\
 &= 2,1 \times 10^6 \text{ cel mL}^{-1}
 \end{aligned}$$



- Adicionalmente, se realizó el monitoreo de crecimiento e inocuidad; con muestreos aleatorios de cultivos de *Chlorella sp* a fin de determinar su densidad de crecimiento e inocuidad del cultivo, no se identificó contaminación del cultivo o algún factor que haya influido en su crecimiento.

**b) Permisos y autorizaciones**

- Se gestionó los permisos correspondientes para el ingreso y toma de muestras en la planta de tratamiento de agua residual de la ciudad de Celendín; ante la oficina del área técnica municipal de agua y saneamiento de la municipalidad provincial de Celendín.
- Se procedió a la toma, almacenamiento y transporte de muestras, provenientes del efluente de la planta de tratamiento de agua residual (PTAR) de la ciudad de Celendín.

**c) Recolección y filtrado al vacío del agua residual**

- Obtenido el permiso de ingreso a la planta de tratamiento de aguas residuales de la ciudad de Celendín; se procedió a la recolección de 20 L de agua residual proveniente del efluente final.
- Estos 20 L de agua residual, fueron trasladados sin preservación hasta el laboratorio de aguas de la Universidad Nacional Autónoma de Chota.
- En el laboratorio, procedimos al filtrado por vacío del agua residual, para eliminar impurezas orgánicas e inorgánicas, presencia de seres celulares u otros, que pudiesen interferir o favorecer en la remoción del etinilestradiol.
- Se dispuso de una porción de papel de filtro con suficiente tamaño para que cubra el área del embudo de Büchner sin exceder. En el matraz de Kitasato, el embudo y el filtro fueron ajustados, haciendo uso de un adaptador de goma; sujetado con una pinza unida a un soporte con una nuez, se conectó al sistema de vacío. Se procedió a mojar el filtro con agua destilada. Con apoyo de una varilla de vidrio, se procedió a verter la suspensión lentamente sobre el filtro, de forma que no se produzca pérdidas por derrame. Se dejó reposar por un tiempo de 1 hora aproximadamente acoplado al vacío hasta que este seco.

#### **d) Instalación del experimento**

- En el laboratorio de ingeniería ambiental de la Universidad Privada del Norte, se pesó el etinilestradiol; desarrollando las siguientes actividades: Se prendió la balanza analítica, se verificó que se encuentre nivelado, verificó la calibración con pesa de 05 mg; se colocó el papel dentro de la balanza para pesar antes de añadir el etinilestradiol, se añadió el etinilestradiol hasta obtener 4mg, se procedió a retirar el papel que contiene el etinilestradiol, se dobló y guardó cada papel de manera temporal hasta ser añadido a cada fotobiorreactor.
- Posteriormente, en la Av. La Cantuta, en el condominio Praderas Park, en un área acondicionada, simulando condiciones de laboratorio; se procedió a instalar y ubicar el experimento, tomando en cuenta la existencia y facilidades de fluido eléctrico, estabilidad en las mesas para situar los fotobiorreactores y cercanía a una fuente de iluminación natural.
- Paralelamente, se procedió a instalar el sistema de aireación e iluminación, siendo fundamental la verificación de su funcionamiento; debido a que algunas piezas presentaron fallas de fabricación, las cuales podrían conllevar a generar errores en la investigación.
- Los fotobiorreactores usados fueron probetas graduadas de plástico de un litro de capacidad.
- Se utilizó 1 litro de agua residual del efluente de la planta de tratamiento de aguas residuales proveniente del distrito de Celendín, en cada fotobiorreactor como matriz experimental.
- Situadas e instaladas las probetas, de acuerdo al orden establecido en el diseño experimental se procedió a añadir el agua residual filtrada, las cepas de microalga *Chlorella sp* y el etinilestradiol, tomando en cuenta las cantidades y unidades previstas; las cuales se detallan en el siguiente punto.
- Una vez instalado el experimento; en los nueve (09) fotobiorreactores de tratamiento, se añadió 100, 200 y 300 mL de microalgas de *Chlorella sp.*, con densidad poblacional de  $2,1 \times 10^6$  cel mL<sup>-1</sup>; luego se añadió 4 mg de etinilestradiol (Previa dilución en 1 mL de metanol), en consideración a lo propuesto por Liyun et al. (2018), quienes indican que en concentraciones de 6 a 16 mgL<sup>-1</sup> de contaminantes, la eficiencia de fotodegradación de *Chlorella sp*, disminuyó del 42% al 24%, pudiendo inhibir la producción de especies reactivas de oxígeno inducidas por las algas.

- Los fotobiorreactores contaron con un sistema de aireación continua, que sirvió como fuente de ingreso de oxígeno; además que permitió homogenizar el agua residual, con el cual se evitó la precipitación de la microalga *Chlorella sp*, tal y como recomienda Salgueiro (2018).
- El sistema de los fotobiorreactores, contó con un fotoperíodo de 12:12, como factor importante en la regulación de la producción y división celular, el sistema estuvo expuesto a luz artificial (luz – día) con una intensidad de 2000 Lux, en un ambiente con temperatura media oscilante entre de  $25 \pm 2^{\circ}\text{C}$ .
- El tiempo de monitoreo en cada fotobiorreactor fue a los 5 días. Al respecto CENTA (2018) recomienda que las evaluaciones se den al menos cada 5 días y 8 días, a fin de que los procesos de depuración se generen y puedan ser evidenciables.
- Puesta en marcha del sistema: El sistema entró inmediatamente en funcionamiento después de su instalación, representando la iniciación de la realización de la investigación.

#### e) **Frecuencia del monitoreo**

Se estableció una frecuencia de monitoreo de una vez por cada cinco días, tomándose las muestras en cada sistema de tratamiento, por un período de veinte días; lo que permitió observar los cambios medulares que ocurrieron.

#### f) **Evaluación de los parámetros de campo**

La evaluación de parámetros de campo; se efectuaron de manera directa en cada fotobiorreactor; haciendo uso de un multiparámetro, medidos diariamente; durante el tiempo que duró el experimento, por ser considerados parámetros influyentes y de gran valor para entender el proceso de remoción de etinilestradiol. A fin de contrastar la validez de los resultados, se procedió a enviar cuatro (04) veces las muestras al Laboratorio Regional del Agua del Gobierno Regional de Cajamarca; para ello, se desarrollaron las siguientes actividades:

- **Preparación de muestra – OD:** En un frasco Winkler de 250 mL, se vertió al ras el agua proveniente del fotobiorreactor (según el tratamiento), se procedió a tapar y eliminar lo sobrante; se abrió el frasco y añadió los preservantes respectivos (Rx1: Sulfato manganeso y Rx2: Hidróxido de sodio, azida de sodio y yoduro de potasio); se volvió a tapar, eliminar el sobrante y homogenizar la muestra con movimientos

circulares lentos. La técnica de detección usado en laboratorio fue: SMEWW-APHA-AWWA-WEF Part 4500-O C, 23rd Ed. 2017. Oxygen (Dissolved). Azide Modification.

- **Preparación de muestra – pH:** En un frasco de plástico de 250 mL, se vertió 200 mL de agua proveniente del fotobiorreactor (según tratamiento). No se añadió preservante de muestra. La técnica utilizada de detección en laboratorio fue: SMEWW-APHA-AWWA-WEF Part 4500-H+ B, 23rd Ed. 2017. pH Value. Electrometric Method.
- **Temperatura:** Se sumergió el electrodo del multiparámetro y registró el valor indicado. El parámetro temperatura, no fue enviado al laboratorio, por ser netamente un parámetro evaluado en campo; puede variar en el transporte o por otro motivo.

### **3.3.2. Etapa de laboratorio**

Definimos como etapa de laboratorio; aquellos procedimientos que se delimitan a la detección del etinilestradiol, mismos que fueron desarrollados por el laboratorio de bioquímica de la Universidad Peruana Cayetano Heredia; quien se encargó del procesamiento de los resultados. Previo a ello, se desarrollaron actividades que contribuyeron a facilitar el envío de las mismas. En general, se realizó:

- Preparación de muestras.
- Conservación de muestras.
- Análisis de muestras.

El laboratorio de la Universidad Peruana Cayetano Heredia; se encargó de asegurar la aplicación de la metodología a través del desarrollo del método analítico de determinación cuantitativo de cromatografía líquida de alta resolución (HPLC), reportando los datos que respaldan dichos resultados, como el análisis de linealidad, estabilidad, precisión, límite de cuantificación y detección, recuperación y cuantificación de etinilestradiol en las muestras.

### **Preparación de muestras para envío a laboratorio**

De acuerdo a lo indicado por el laboratorio; se procedió a realizar lo siguiente:

- Se depositó 15 mL de muestra de cada fotobiorreactor al tubo cónicos los cuales fueron llevados a ser centrifugados por 15 minutos a 1500 rpm.
- Una vez centrifugadas, con la ayuda de una jeringa se extrajo 4 mL del sobrenadante, el cual fue colocado a un nuevo tubo cónico para centrifuga (Previamente filtrada, haciendo uso de un filtro simplepure de jeringa estéril, de 0,54  $\mu\text{m}$  de tamaño), luego se añadió 1mL de metanol (Previamente filtrado, de acuerdo a la descripción anterior); se agitó lentamente (en círculos) hasta obtener una mezcla homogénea.
- Se repitió el procedimiento para cada muestra.

### **Conservación y envío de muestras**

- Una vez culminado el procedimiento de preparación de muestras, se procedió a embalar las muestras cuidadosamente, fueron colocadas en un cooler con su respectivo ice pack; con intención de mantener una temperatura menor a 4°C y ser enviados al laboratorio.
- Los envíos de las muestras se realizaron por medio terrestre, de acuerdo a la frecuencia de monitoreo.

### **Análisis de muestras en laboratorio**

Una vez recepcionadas las muestras, el laboratorio desarrolló el siguiente procedimiento:

#### **- Condición cromatográfica para el análisis de etinilestradiol**

Se usó metodología por HPLC descrita por Marina da Silva Daniel; Elizabete Campos de Lima (1), Butt Khadheja et al (3) y Fonseca AP et al (4). Para el análisis se administraron 20  $\mu\text{L}$  de las soluciones del eluato (muestra) y estándar a través de un inyector automático en el sistema HPLC-DAD modelo 1260 (Agilent, USA). La separación se realizó en una columna Zorbax SB 5  $\mu\text{m}$ , 150 x 4,6 mm. La fase móvil consistió en una mezcla de Acetonitrilo: Agua: ácido fosfórico (50: 50: 0.05, v/v). El horno de la columna se mantuvo a una temperatura de 40 °C y el flujo fue de 1,0 mL  $\text{min}^{-1}$ . La detección del etinilestradiol se realizó a 280 nanómetros (nm).

#### **- Análisis cuantitativo**

Se preparó una curva de calibración midiendo las áreas de los picos a partir de las cuales se calculó la concentración de etinilestradiol en las muestras de agua residual (1,3,4,5,6).

$$C \left( \frac{\mu\text{g}}{\text{mL}} \text{ o } \frac{\text{mg}}{\text{L}} \right) = \frac{A_m}{A_{st}} \times C_{st} \times F_d \times p \dots\dots\dots \text{N}^\circ 1$$

Donde:

C = concentración de la muestra

A<sub>m</sub>: área de la muestra

A<sub>st</sub>: área del estándar

C<sub>st</sub>: concentración del estándar

F<sub>d</sub>: inversa del factor de dilución

p: potencia

- **Linealidad del método**

Se usó metodología original descrita por Marina da Silva Daniel; Elizabete Campos de Lima (1), Butt Khadheja et al (3) y Fonseca AP et al (4), las concentraciones de las diluciones se variaron a conveniencia. Desde la solución madre de 10 mg de Etinilestradiol en 25 mL de Acetonitrilo se realizaron diluciones teóricas con fase móvil a 16  $\mu\text{g mL}^{-1}$ , 8  $\mu\text{g mL}^{-1}$ , 4  $\mu\text{g mL}^{-1}$ , 2  $\mu\text{g mL}^{-1}$ , 1  $\mu\text{g mL}^{-1}$ , 0,5  $\mu\text{g mL}^{-1}$  y 0,25  $\mu\text{g mL}^{-1}$ , y fueron almacenadas a 4 °C. Se realizó 2 mezclas (n=2), y 2 inyecciones (réplicas) de 20  $\mu\text{L}$  de las mezclas de las soluciones estándares de Etinilestradiol al sistema HPLC-DAD.

Se realizó una curva de calibración con 7 niveles de concentración teóricos a 0,25  $\mu\text{g mL}^{-1}$ , 0,50  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ; 1,01  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ; 2,02  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ; 4,04  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ; 8,08  $\mu\text{g mL}^{-1}$  y 16,15  $\mu\text{g mL}^{-1}$  a partir de la solución madre de 412  $\mu\text{g mL}^{-1}$  de Etinilestradiol.

En la Figura 6, se muestra la curva de calibración obtenida en función del promedio de las áreas cromatográficas frente a la concentración del estándar de etinilestradiol, los resultados del promedio de las 6 inyecciones (n=2, 2 inyecciones para cada mezcla) se muestran en la Tabla 5.

La curva de calibración para el Etinilestradiol corresponde a una línea recta cuya ecuación es  $y=47,735x - 2,7147$  con un  $R^2= 0,9999$ ; ello indica que existe una relación lineal entre el área y su concentración. En la figura 23 (Anexos) se muestra el cromatograma obtenido para el estándar de Etinilestradiol cuyo tiempo de retención fue de 4,5 minutos en las condiciones ensayadas.

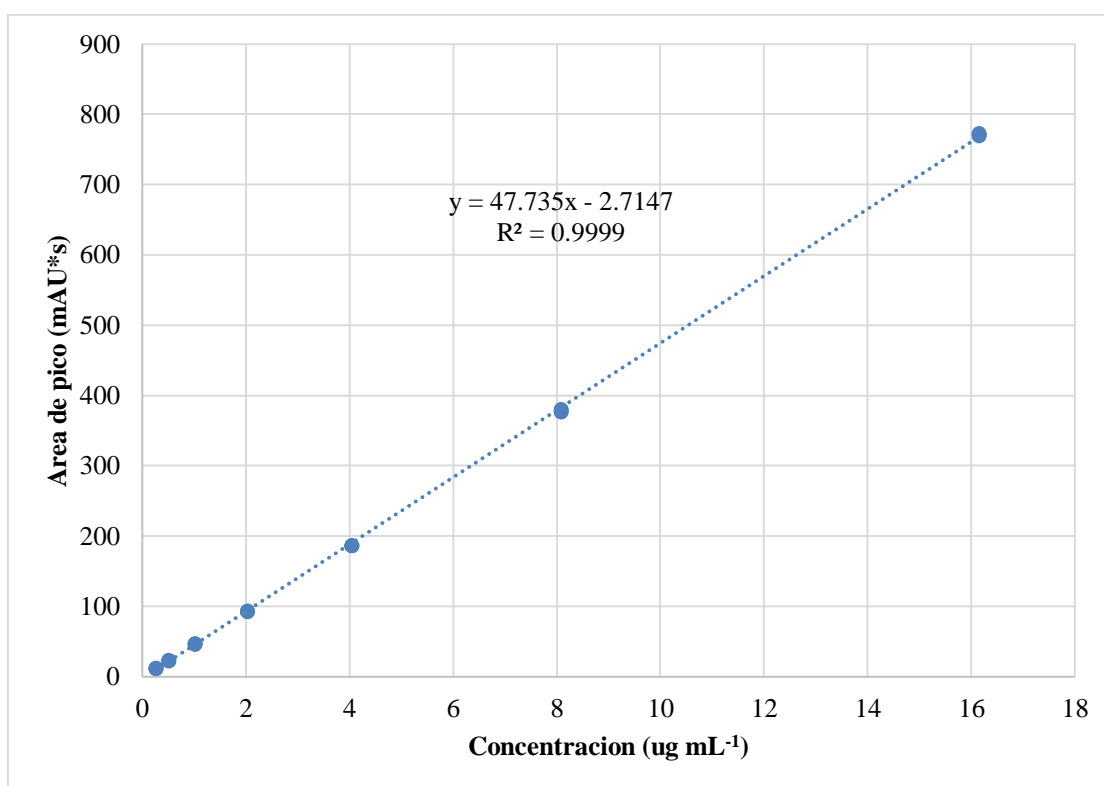
**Tabla 5**

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

Etinil_estradiol ( $\mu\text{g mL}^{-1}$ )	Área pico cromatográfico (mAU*s)				Prom.	Desv. Estándar
	M1A	M1B	M2A	M2B		
0,25	12,49	11,40	11,22	11,50	11,68	0,56
0,5	22,93	22,96	23,65	23,05	23,13	0,34
1,01	46,55	46,29	46,69	47,50	46,76	0,52
2,02	92,47	93,26	92,91	93,80	93,11	0,56
4,04	186,65	186,30	186,59	186,15	186,42	0,23
8,08	376,77	377,16	379,38	380,84	378,54	1,91
16,15	771,04	772,68	771,86	769,44	771,26	1,38

**Figura 6**

*Curva de calibración para el estándar de Etinilestradiol.*



- **Test de regresión lineal simple**

Se utilizó una prueba de regresión lineal simple para explicar la relación entre la respuesta (eje y) y las variables explicativas (eje x) utilizando la siguiente fórmula descrita por Pedroza y Diskovski (2) en Statistical Analysis Systems.

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

Donde:

- $\gamma$ : respuesta
- $\alpha$ : Intercepto
- $\beta$ : pendiente de la recta
- X: variable explicativa

- **Coefficiente de correlación lineal y coeficiente de determinación**

Para determinar si existe una relación lineal entre la respuesta y las variables explicativas se utilizó la siguiente fórmula descrita en Statistical Analysis Systems por Pedroza y Diskowski (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 ( $R^2$ ) es el cuadrado del coeficiente de correlación muestral (2).

- **Análisis de estabilidad**

A condiciones de temperatura ambiental, se evaluó la estabilidad del estándar de Etinilestradiol a 4 ug mL<sup>-1</sup> 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 Etinilestradiol y se obtuvo las concentraciones a partir de la ecuación de la recta, tal como se muestra en la Tabla 6.



Se evaluó la estabilidad a las 24 y 48 horas del estándar a una concentración de 4,3 ug mL<sup>-1</sup> para corroborar si existe algún cambio estándar durante el tiempo que permaneció dentro del sistema HPLC, la concentración del estándar se mantuvo cerca al 100 % (concentración inicial), es decir estos fueron estables.

**Tabla 6**

*Evaluación de la estabilidad de Etinilestradiol a 4,3 ug mL<sup>-1</sup>*

<b>Estabilidad</b>	<b>Área de</b>	<b>Concentración</b>	<b>Concentración</b>	<b>Concentración</b>	<b>DSR</b>	<b>DS</b>
<b>Tiempo</b>	<b>Pico</b>	<b>(ug mL<sup>-1</sup>)</b>	<b>Promedio</b>	<b>(%)</b>	<b>(%)</b>	
INICIAL	206,08	4,374	4,370	100,00	0,1060	0,00463
	205,64	4,365				
	205,91	4,371				
24 Horas	204,36	4,338	4,336	99,22	0,3731	0,01618
	203,42	4,319				
	204,96	4,351				
48 horas	202,46	4,298	4,293	98,24	0,1084	0,00465
	202,13	4,291				
	202,03	4,289				

**- 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<sup>-1</sup> de soluciones estándar de Etinilestradiol, esta debe ser menor del 2 %, según lo mencionado por Marina da Silva Daniel; Elizabete Campos de Lima (1), Butt Khadheeja et al (3) y Fonseca AP et al (4).

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

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

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 precisión se realizó 6 inyecciones a una concentración teórica de 4,04  $\mu\text{g mL}^{-1}$  de la solución estándar de Etinilestradiol. Los %DSR para las áreas y tiempo de retención son menores al 2% (Tabla 7); por lo tanto, el método analítico es preciso.

**Tabla 7**

*Precisión del sistema cromatográfico en tiempo de retención y áreas de las señales cromatográficas del estándar de Etinilestradiol a la concentración de 4,04  $\mu\text{g mL}^{-1}$*

Inyección o réplicas	Tiempo de retención (min)	Áreas de picos
1	4,62	203,76
2	4,62	201,79
3	4,62	203,85
4	4,62	201,06
5	4,61	202,69
6	4,61	202,46
$\bar{x}$	4,62	202,60
DS	0,00186	1,09203
DSR (%)	0,04029	0,53899

- **Determinación del límite de cuantificación**

Se determinó a partir de los datos de siete diluciones cuyas concentraciones teóricas fueron 16  $\mu\text{g mL}^{-1}$ , 8  $\mu\text{g mL}^{-1}$ , 4  $\mu\text{g mL}^{-1}$ , 2  $\mu\text{g mL}^{-1}$ , 1  $\mu\text{g mL}^{-1}$ , 0,5  $\mu\text{g mL}^{-1}$  y 0,25  $\mu\text{g mL}^{-1}$ , 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, 4, 5 y 6) que se detallan a continuación.

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

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

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

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

Donde:

LC: límite de cuantificación

LD: límite de detección

DS: desviación estándar

$\beta$ : pendiente de la curva de calibración

$\alpha$ : intercepto

$S^2_{xy}$  = Varianza

Se aplicó la ecuación de la recta y se determinó las concentraciones experimentales de las siete diluciones de 0,25 ug mL<sup>-1</sup>; 0,50 ug mL<sup>-1</sup>; 1,01 ug mL<sup>-1</sup>; 2,02 ug mL<sup>-1</sup>; 4,04 ug mL<sup>-1</sup>; 8,08 ug mL<sup>-1</sup> y 16,15 ug mL<sup>-1</sup>. Los datos empleados en los cálculos se muestran en la Tabla 8 y los resultados de LD y LC que fueron 0, 202 ug mL<sup>-1</sup> y 0,674 ug mL<sup>-1</sup> se muestran en la Tabla 9.

**Tabla 8***Datos para calcular los límites de detección y de cuantificación de Etinilestradiol*

<b>n=28</b>	<b>x</b>	<b>y</b>	<b>x.y</b>	<b>y<sup>2</sup></b>	<b>y/x</b>	<b>Varianza</b>
1	0,25	12,49	3,12	156,09	49,97	
2	0,25	11,40	2,85	130,10	45,62	
3	0,25	11,22	2,81	126,07	44,91	
4	0,25	11,50	2,88	132,34	46,01	
<b>n=28</b>	<b>x</b>	<b>y</b>	<b>x.y</b>	<b>y<sup>2</sup></b>	<b>y/x</b>	<b>Varianza</b>
1	0,50	22,93	11,47	525,95	45,86	
2	0,50	22,96	11,48	527,46	45,93	
3	0,50	23,65	11,83	559,67	47,31	
4	0,50	23,055	11,53	531,54	46,11	
1	1,01	46,55	47,03	2167,74	46,09	
2	1,01	46,29	46,75	2142,87	45,83	
3	1,01	46,69	47,16	2180,39	46,23	
4	1,01	47,51	47,98	2257,176	47,03	
1	2,02	92,47	186,78	8550,71	45,77	
2	2,02	93,261	188,38	8697,61	46,16	
3	2,02	92,92	187,69	8633,40	45,99	
4	2,02	93,81	189,49	8800,25	46,44	
1	4,04	186,65	754,08	34839,89	46,20	
2	4,04	186,3064	752,68	34710,07	46,11	
3	4,04	186,59029	753,82	34815,94	46,18	
4	4,04	186,15562	752,07	34653,91	46,07	
1	8,08	376,7742	3044,34	141958,79	46,63	
2	8,08	377,16068	3047,46	142250,17	46,67	
3	8,08	379,38275	3065,41	143931,27	46,95	
4	8,08	380,84805	3077,25	145045,24	47,13	
1	16,15	771,0448	12452,37	594510,08	47,74	
2	16,15	772,68854	12478,92	597047,57	47,84	
3	16,15	771,86945	12465,69	595782,45	47,79	
4	16,15	769,44299	12426,50	592042,52	47,64	
SUMA	128,2	6043,67478	66069,86	3137707,33	1304,35	4,5403

 $\alpha$  -2.7147 $\beta$  47,735

V 10,3664

DS 3,2197

LD 0,2023

LC 0,6745

**Tabla 9**

*Límites de cuantificación y detección del Etinilestradiol.*

<b>Compuesto</b>	<b>LD (ug mL<sup>-1</sup>)</b>	<b>LC (ug mL<sup>-1</sup>)</b>
Etinilestradiol	0,202	0,674

- **Análisis de recuperación**

Se usó metodología descrita por Marina da Silva Daniel; Elizabete Campos de Lima (1) y se usó la fórmula planteada por Butt Khadheja et al (3) y Fonseca AP et al (4). Se añadió una cantidad conocida de 4 ug mL<sup>-1</sup> de Etinilestradiol 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 4,252 ug mL<sup>-1</sup> de Etinilestradiol, se hizo tres inyecciones a cada mezcla.

Se obtuvo las concentraciones mediante la ecuación N°2, considerando la potencia del Etinilestradiol de 98,0%.

La recuperación obtenida fue 99,54 % ± 0,0197 y la desviación estándar de relativa (DSR) fue de 0,466 %; como se muestra en la Tabla 10 y 11, las cuales están dentro del rango de 98-102% que valida la exactitud del método.

**Tabla 10**

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

Muestra	Área de Pico	Concentración encontrada (ug mL <sup>-1</sup> )	Concentración Promedio	Recuperación (%)	DRS (%)	DS
SPIKED	199,38609	4,23				
Muestra 1	199,32117	4,23				
	200,99947	4,27	4,23	99,54	0,47	0,02
SPIKED	199,50688	4,24				
Muestra 2	198,54244	4,21				
	198,33209	4,21				

**Tabla 11**

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

Compuesto	Concentración declarada (ug mL <sup>-1</sup> )	Concentración encontrada (ug mL <sup>-1</sup> )	Recuperación (% media ± DS)	DSR (%)
Etinilestradiol	4,25	4,23	99,54 ± 0,019	0,47

### 3.3.3. Etapa de gabinete

El porcentaje de remoción de etinilestradiol se estimó de la siguiente manera:

- Se efectuó el cálculo de los valores promedios de etinilestradiol; para cada tratamiento del sistema de fotobiorreactores utilizando la microalga *Chlorella sp.*, empleando la siguiente fórmula:

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

Dónde:

$\bar{X}$  = promedio aritmético

x = valor individual de cada dato

n = número de datos

- Los valores conseguidos en cada sistema de fotobiorreactores monitoreado, fueron usados para el cálculo del porcentaje de remoción de etinilestradiol, para cada uno de los tratamientos con microalgas *Chlorella sp* y testigos.

$$\% \text{ remoción} = \frac{C_i \text{ etinilestradiol} - C_f \text{ etinilestradiol}}{C_i \text{ etinilestradiol}} * 100$$

**Dónde:**

% remoción : Eficiencia de remoción de etinilestradiol (%)

$C_i$  etinilestradiol : Concentración inicial de etinilestradiol (4 mg L<sup>-1</sup> de dosis administrada).

$C_f$  etinilestradiol : Concentración final de etinilestradiol, en los fotobiorreactor blanco y tratamientos de microalgas *Chlorella sp*

**3.3.4. Diseño estadístico**

El análisis y el procesamiento de datos; se trabajó haciendo uso del diseño estadístico Completamente Randomizado, con tres tratamientos y tres repeticiones. Además, se realizó un análisis estadístico por el cual se determinó la prueba de normalidad de la eficiencia de remoción del etinilestradiol, prueba de homogeneidad de la eficiencia de remoción de etinilestradiol de F de Levene, Análisis de varianza (ANOVA) de la eficiencia de remoción de etinilestradiol, Prueba de Tukey, Prueba de variación de medias y Pruebas de homogeneidad de la densidad poblacional de *Chlorella sp.*, de F de Levene (Las cuales se detallan en los anexos).

## CAPÍTULO IV

### RESULTADOS Y DISCUSIÓN

#### Determinación del etinilestradiol en el efluente de la planta de tratamiento de aguas residuales de Celendín, Cajamarca

**Tabla 12**

*Concentración de etinilestradiol en el efluente de la PTAR – Celendín*

Código muestra <sup>s</sup>	Área de pico cromatográfico			Concentración (mg L <sup>-1</sup> )			Promedio (mg L <sup>-1</sup> )	Desviación estándar
	1	2	3	1	2	3		
<b>PTAR</b>	0,033	0,029	0,032	0,003 4	0,003 4	0,003 3	0,0034	0,001

Se determinó la concentración de etinilestradiol en una muestra del efluente de la planta de tratamiento de aguas residuales de Celendín, Cajamarca, Perú; siendo su concentración 0,0034 mg L<sup>-1</sup>. Al respecto, Petrovic et al. (2021) señalan que los estrógenos presentes en el ambiente se deben a descargas y/o excreciones que provienen de fuentes naturales y antropogénicas. Por origen natural, tenemos la excreción diaria humana de estradiol, estrona y estriol mismos que varían de hombre (1,6; 3,9 y 1,5 µg) a mujer (3,5; 3,8 y 4,8 µg) y en mujeres embarazadas diariamente se evidencia una excreción de estriol de hasta 6 000 µg.

De Jesús (2020) manifiesta que la concentración de contaminantes emergentes en el ambiente; se debe especialmente por la disposición de las aguas residuales municipales. La presencia en los condicionantes ambientes de estos contaminantes, a pesar de no ser significativa en términos de concentración, simbolizan un potencial riesgo para la salud. Se ha descubierto que los sistemas convencionales de tratamientos de aguas residuales son ineficaces para eliminar la mayoría de los contaminantes emergentes, por lo que se necesitan tratamientos de tipo avanzados para reducir su concentración en los efluentes de aguas residuales.

Los estrógenos esteroides no se eliminan por completo durante el tratamiento de aguas residuales, en sistemas de tipo convencional; siendo esto, la razón de estar clasificados en



la lista de vigilancia en la normativa europea, debido a sus posibles riesgos para el medio acuático (Yien et al., 2019)

Hom et al. (2019) señalan que los actuales tratamientos de aguas residuales son ineficientes y limitadas para eliminar estos compuestos; representando un grave problema. Sumado a esto la falta de regulación normativa; es por ello, que las hormonas esteroides y sus análogos estructurales constituyen una preocupación ambiental crítica. Estos “estrógenos ambientales” pueden poner en peligro la reproducción y desarrollo de la fauna acuática, incluso a concentraciones muy bajas (nanogramos por litro) (Ayala, 2017).

Por otro lado, Khan et al. (2020) señalan que han observado que sólo el 18-32% de los residuos farmacéuticos podrían degradarse mediante tratamiento secundario, presentando un aumento de eliminación entre 30-65% mediante el tratamiento terciario en condiciones de tratamientos especiales, apoyando los resultados encontrados en la presente investigación.

La preocupación frente a esto, surge debido a que los productos farmacéuticos son microcontaminantes que, incluso en dosis bajas, puede inducir efectos fisiológicos en humanos y otros organismos del medio ambiente. Su estructura estable resiste la desintegración y consecuentemente induce a una mayor persistencia en el medio ambiente; por lo tanto, permanece biológicamente activo. Las fuentes principales de estos productos farmacéuticos al medio hídrico son los efluentes de las plantas de tratamiento de aguas residuales, aguas de escorrentía provenientes de la agricultura y las tierras de cultivo, y el sorbo de lixiviados de vertedero (Hena et al., 2020).

Tal y como lo mencionan Spindola et al. (2018) al referir que los estrógenos; entre ellos la estrona,  $17\beta$ -estradiol y  $17\alpha$ EE, que no pueden ser eliminados o degradados de forma completa por las plantas convencionales de tratamiento de aguas residuales, a menudo son persistentes y se liberan diariamente en cuerpos de agua, que más adelante pueden servir como fuentes de agua potable, generando un problema mucho más álgido. Según el estudio presentado por Grdulska & Kowalik (2020), sobre productos farmacéuticos en agua y aguas residuales: descripción general; mencionan que los fármacos que se identifican con mayor frecuencia en las aguas residuales son las hormonas sexuales (estradiol, éster, etinilestradiol,  $17\beta$ -estradiol) y fármacos antiepilépticos.

## Determinación de remoción de etinilestradiol en el sistema de fotobiorreactores de tratamiento

**Tabla 13**

*Concentraciones de los residuos de Etinilestradiol en muestras de agua residual tratadas con microalga Chlorella sp.*

<b>Código Tto.</b>	<b>Prom. (mg L<sup>-1</sup>)</b>	<b>Desv. Estándar</b>	<b>Chlorella sp. (mL L<sup>-1</sup>)</b>
T <sub>0</sub>	4,05	0,01	0
T <sub>0(5D)</sub>	3,89	0,01	0
T <sub>16R1</sub>	0,38	0,04	200
T <sub>17R3</sub>	0,17	0,02	300
T <sub>18R2</sub>	1,06	0,005	100
T <sub>19R3</sub>	1,06	0,005	100
T <sub>20R2</sub>	0,95	0,14	200
T <sub>21R1</sub>	1,32	0,005	100
T <sub>22R2</sub>	0,13	0,005	300
T <sub>23R1</sub>	0,12	0,023	300
T <sub>24R3</sub>	0,91	0,125	200

En los tratamientos de control T<sub>0</sub> y T<sub>0(5)</sub>, no se añadió la microalga *Chlorella sp.*, con la finalidad de determinar si existe o no remoción por condiciones de degradación natural del etinilestradiol en presencia del agua residual; considerando dos periodos de monitoreo a tiempo cero y posterior a cinco días. Los resultados, tal como se muestran en la Tabla 12, evidencian que no existe proceso de degradación alguna; ayudando a entender que las mediaciones de las microalgas son fundamentales en el proceso de remoción. Que estos valores no fluctúen de manera lejana a 4 mg L<sup>-1</sup>, puede deberse a que el etinilestradiol como compuesto químico, al no haber sido sujetos a tratamiento no presenta remoción.

Como señalan Mackulak et al. (2019) esto es debido a que las plantas de tratamiento de aguas residuales no pueden degradar eficazmente los productos farmacéuticos, los medicamentos y sus metabolitos modernos y eliminar los microorganismos resistentes a los antibióticos, estos compuestos se encuentran en el efluente de la planta de tratamiento de aguas residuales y/o se absorben en el lodo, se convierten en abono y posteriormente se aplican en la agricultura.

Al respecto Jun et al. (2017) evidenciaron en su investigación, que en los tratamientos de control existe una nula degradación, debido a que no estuvieron sometidos a ningún tipo de tratamiento.

Tejedor (2021) señala que los procesos de biotransformación consisten en la transformación a compuestos más hidrosolubles que puedan ser excretados producto de una reacción química en el organismo; pero que en general, sin presencia de un estímulo, no ocurre.

Ruksrithong & Phattarapattamawong (2019) en su investigación “Mecanismos de eliminación de estrona y  $17\beta$ -estradiol por cultivo de microalgas: cinética y eliminación”; encontraron que los controles de la investigación, presentaron nula remoción de estrógenos.

Los demás tratamientos sometidos a la biomasa fresca de *Chlorella sp.*, presentaron remoción de etinilestradiol. De manera general se puede manifestar que la presencia de microalgas *Chlorella sp.*, son determinantes en los procesos de degradación. En relación a esto, Jun et al. (2017) señala que la biomasa de microalgas *Chlorella*, tienen la capacidad de tolerar medios hostiles (haciendo referencia a la concentración de etinilestradiol igual a  $5 \text{ mg L}^{-1}$ ), presentando una muy buena condición de eliminación.

Asimismo, se hace necesario, señalar que existen hallazgos que demuestran que no solo algunas bacterias específicas pueden degradar los estrógenos, sino que también las microalgas que viven ampliamente pueden degradar estos contaminantes emergentes, lo que sugiere que las microalgas podrían ser un tratamiento avanzado en los sistemas de tratamiento de aguas residuales para facilitar la eliminación de nutrientes y estrógenos (Wang et al., 2019).

Los contaminantes emergentes, son subproductos de agregados cuyos vertidos pueden generar problemas sanitarios y ambientales que aún no ha sido identificados de manera amplia y ni han sido regulado de una manera suficiente; son considerados como contaminantes no persistentes necesariamente, pero presentan características como poseer un alto nivel de solubilidad en agua, siendo capaces de introducirse en cualesquiera de las etapas del ciclo del agua (iAgua, 2020).

## Determinación de parámetros fisicoquímicos en el sistema de fotobiorreactores de tratamiento

**Tabla 14**

*Valores promedios de parámetros de campo*

Tratamiento	Oxígeno disuelto (OD) mg O <sub>2</sub> L <sup>-1</sup>	pH	Temperatura (°C)	Tiempo de retención hidráulica (días)	Volumen (L)
T0	8,80	7,40	18,90	5	1
T0	7,00	7,12	18,40	5	1
T0	7,40	5,50	18,70	5	1
T0(5D)	8,20	7,10	19,70	5	1
T0(5D)	7,90	7,20	18,00	5	1
T0(5D)	7,80	7,11	19,40	5	1
T <sub>16R1</sub>	16,90	7,12	23,20	5	1
T <sub>17R3</sub>	16,80	6,80	23,50	5	1
T <sub>18R2</sub>	16,90	7,15	22,00	5	1
T <sub>19R3</sub>	16,50	7,18	22,40	5	1
T <sub>20R2</sub>	16,60	7,10	23,00	5	1
T <sub>21R1</sub>	16,40	7,00	22,40	5	1
T <sub>22R2</sub>	16,70	7,10	24,30	5	1
T <sub>23R1</sub>	17,00	7,10	24,56	5	1
T <sub>24R3</sub>	16,20	7,50	22,50	5	1
Promedio	13,10	7,03	21,40	5	1

*Nota:* Valores promedios en el periodo de tiempo que duro el experimento.

La Tabla 13, muestra los valores de oxígeno disuelto promedios, presentes en el sistema de tratamiento. En el tratamiento T0 y T0(5D) se aprecia que los valores de OD son los más bajos debido a que son características de las aguas residuales, sin presencia de microalgas u organismos que favorezcan su proceso de oxigenación. Al respecto la DIGESA (2020) señala que la presencia de oxígeno en el agua se debe a la disolución del oxígeno atmosférico y a que una pequeña cantidad se debe a su formación durante la fotosíntesis principalmente de algas; pudiendo encontrarse en valores de concentración que oscilan entre 7,03 mg L<sup>-1</sup> a 14,74 mg L<sup>-1</sup> de acuerdo a la temperatura y pH, como condiciones esenciales.

Asimismo, se señala que, por lo general, las aguas residuales en las plantas de tratamiento para vertidos domésticos, el parámetro de oxígeno disuelto, se presente en valores que varíen entre 8 mg L<sup>-1</sup> y 16 mg L<sup>-1</sup>; teniendo en cuenta el punto de monitoreo, presencia de microorganismos que favorezcan procesos de oxigenación, entre otros procesos de degradación (Lozano, 2020).

Los demás tratamientos experimentales fueron sometidos a oxigenación permanente con la intención de que las microalgas *Chlorella sp.*, no precipiten, ni se adhieran en las paredes del fotobiorreactor y se encuentren activas en el proceso de remoción de etinilestradiol.

Neilson & Lewin (2020) señalan que los procesos de adsorción se comportan como una etapa inicial en la biodegradación que sufren los contaminantes; por otro lado, la biodegradación de contaminantes farmacéuticos por el uso de microalgas puede tener relación de manera directa por la presencia de los metabolitos heterótrofos; o mediante la acción de enzimas extracelulares. En relación a ello, Muñoz y Guleysse (2018) señala que de un modo indirecto los contaminantes pueden ser degradados por el incremento del oxígeno disuelto en el agua, debido a procesos mediados por la fotosíntesis por la alteración del pH, o en algunos casos por la simbiosis establecida mediadas por las bacterias.

Respecto a los valores promedios de temperatura del tratamiento T0 y T0(5D), perteneciente al testigo; se evidenció temperaturas que van entre 18,00 y 19,70 °C; debido a que la temperatura promedio en las aguas residuales, son próximas a estos valores (Castillo, 2017).

Los valores de temperatura promedio presentes en los tratamientos experimentales; varían entre 22,00 y 24,56. Representando los más óptimos los tratamientos T<sub>17R3</sub>, T<sub>22R2</sub>, T<sub>32R1</sub> (Correspondientes a la densidad poblacional de microalgas *Chlorella sp.*, de 300 mg L<sup>-1</sup>) siendo estos tratamientos en donde se evidenció una mayor remoción de etinilestradiol. Al respecto Huang et al. (2019) señalan que mantener una temperatura de 24°C en los tratamientos experimentales, facilitan el crecimiento de las algas, lo cual a su vez favorece la eficiencia de remoción de estrógenos. Por otro lado, Park et al. (2019) manifiesta que es ineludible implantar un intervalo de óptima temperatura, entre 16 y 27 °C, para que la tasa de crecimiento de microalgas *Chlorella sp.*, sea elevada.

Asimismo, Huang et al. (2019) señalan que en tratamientos con temperatura de 25°C facilita el crecimiento de las algas, lo cual tiene un impacto directo sobre la bioadsorción de los contaminantes estrogénicos.

Sobre los valores de pH, el tratamiento T0 y T0(5D), presentan valores que van desde 5,50 a 7,40; pudiendo deberse a las características más resaltantes de las aguas residuales; al respecto Yáñez (2018) señala que el pH en las aguas residuales puede variar desde 3,5 a 7,0 según la estacionalidad.

Los tratamientos experimentales; presentan valores aproximados que oscilan entre 6,8 a 7,50; pudiendo deberse a las reacciones existentes entre las aguas residuales, el contaminante (etinilestradiol) y las microalgas *Chlorella sp.*

Estos valores de pH son considerados como óptimos para el proceso de crecimiento y desarrollo de las microalgas *Chlorella sp.*; tal y como lo menciona Huang et al. (2019) en su investigación: “Efectos ecotoxicológicos y eliminación de 17β-estradiol en algas *Chlorella*”, cuando el pH es igual a 5,0 o 9,0; el crecimiento de *Chlorella* no es el más óptimo; eligiéndose valores óptimos de pH entre  $7,0 \pm 0,2$ . Asimismo, Ruksrithong & Phattarapattamawong (2019) en su investigación “Mecanismos de eliminación de estrona y 17β-estradiol por cultivo de microalgas: cinética y eliminación”; señalan que en situaciones necesarias, los rangos de pH deben ser ajustados entre 6,8 – 7,0; a fin de promover una remoción eficiente de etinilestradiol, que vayan desde un 52% a 99%.

## Efecto de la densidad poblacional de *Chlorella sp.*, en la remoción de etinilestradiol

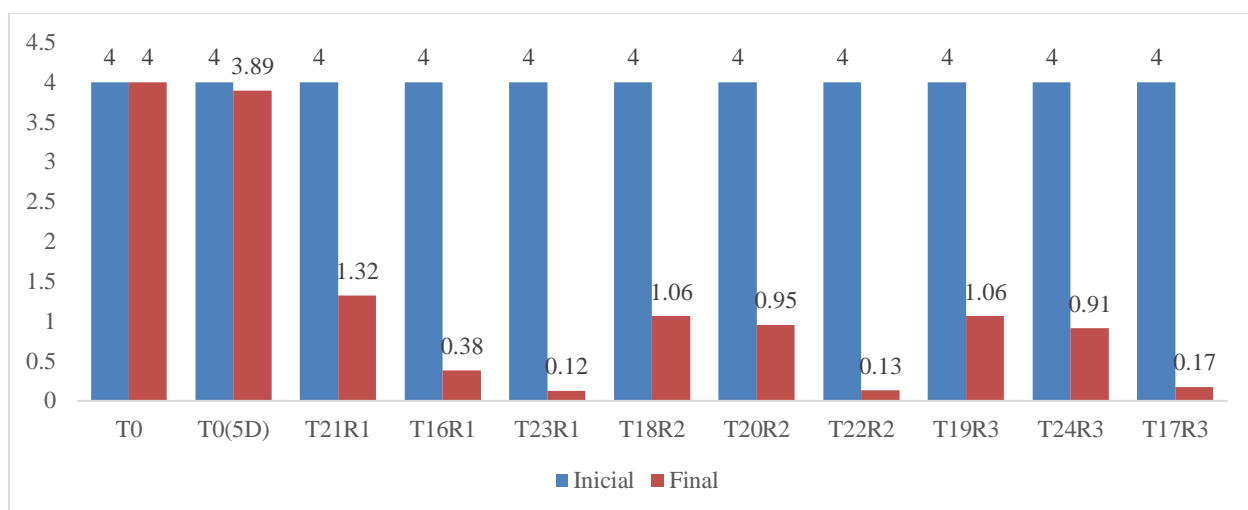
**Tabla 15**

Concentraciones de los promedios de residuos de Etinilestradiol en muestras de agua residual tratadas con microalgas *Chlorella sp.* inicial y final.

Código Muestra	Concentración Promedio $\pm$ DS Inicial (mg L <sup>-1</sup> )	Concentración Promedio $\pm$ DS final (mg L <sup>-1</sup> )
To	4,048 $\pm$ 0,0111	3,895 $\pm$ 0,0144
T16R1	4,048 $\pm$ 0,0111	0,376 $\pm$ 0,0336
T17R3	4,048 $\pm$ 0,0111	0,167 $\pm$ 0,0106
T18R2	4,048 $\pm$ 0,0111	1,057 $\pm$ 0,0055
T19R3	4,048 $\pm$ 0,0111	1,058 $\pm$ 0,0050
T20R2	4,048 $\pm$ 0,0111	0,947 $\pm$ 0,1439
T21R1	4,048 $\pm$ 0,0111	1,315 $\pm$ 0,0048
T22R2	4,048 $\pm$ 0,0111	0,128 $\pm$ 0,0051
T23R1	4,048 $\pm$ 0,0111	0,116 $\pm$ 0,0239
T24R3	4,048 $\pm$ 0,0111	0,907 $\pm$ 0,1248

**Figura 7**

Concentraciones de los promedios de residuos de Etinilestradiol en muestras de agua residual tratadas con microalgas *Chlorella sp.* inicial y final.



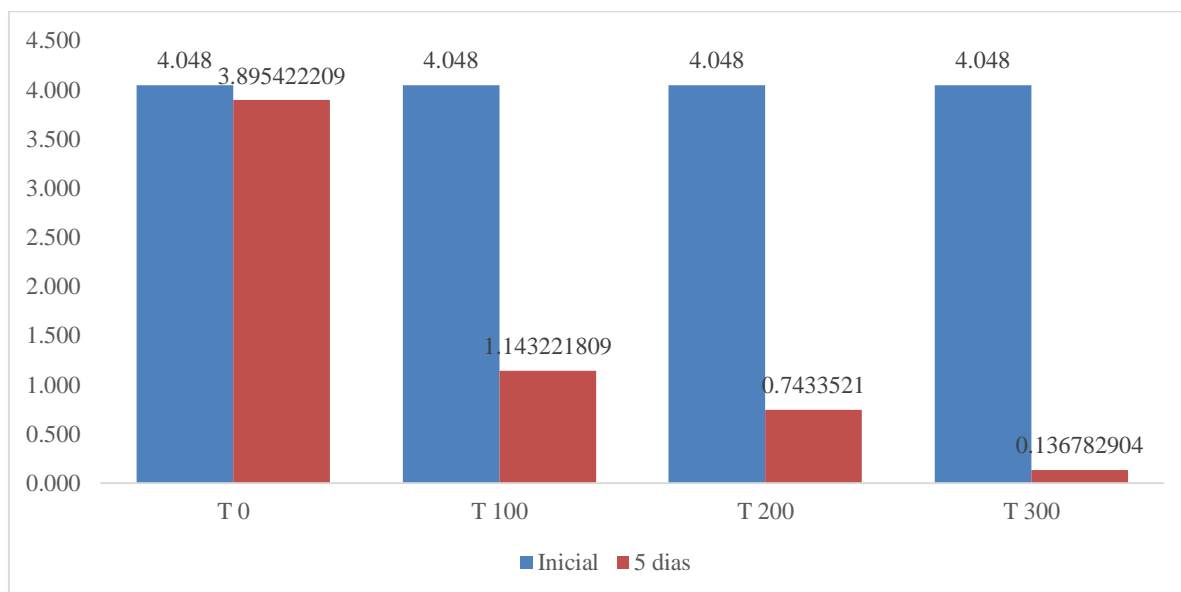
**Tabla 16**

Concentración del promedio de residuo de Etinilestradiol en muestras de agua residual tratadas con microalgas *Chlorella sp.* (100 mL L<sup>-1</sup>, 200 mL L<sup>-1</sup> y 300 mL L<sup>-1</sup>) inicial y final

Código Muestra	<i>Chlorella sp.</i> (mL L <sup>-1</sup> )	Concentración (mg L <sup>-1</sup> )	Promedio (mg L <sup>-1</sup> )	Desviación Estándar	Reducción (%) Etinilestradiol
To	0	4,048	4,048	0,0111	
To 5D	0	3,895	3,895	0,0144	
T18R2	100	1,057			
T19R3	100	1,058	1,143	0,1486	70,65
T21R1	100	1,315			
T16R1	200	0,376			
T20R2	200	0,947	0,743	0,3186	80,92
T24R3	200	0,907			
T17R3	300	0,167			
T22R2	300	0,128	0,137	0,0266	96,49
T23R1	300	0,116			

**Figura 8**

Concentración del promedio de residuo de Etinilestradiol en muestras de agua residual tratadas con microalgas *Chlorella sp.* (100 mL L<sup>-1</sup>, 200 mL L<sup>-1</sup> y 300 mL L<sup>-1</sup>) inicial y final





Los valores obtenidos en los tratamientos T<sub>18R2</sub>, T<sub>19R3</sub>, T<sub>21R1</sub>; presentan una remoción promedio de etinilestradiol de 70,65% aproximadamente; pudiendo estar relacionada a la baja densidad poblacional de microalgas *Chlorella sp.*, sometidos a 100 mL de biomasa fresca de *Chlorella sp.*, la cual alcanzó una densidad poblacional promedio de  $3,1 \times 10^6$  cel mL<sup>-1</sup> y a una concentración de 4 mgL<sup>-1</sup> de etinilestradiol. Se evidencia una remoción mayor al 50%, superando las expectativas; siendo la explicación más viable al hecho, el proceso de oxigenación, correcta iluminación y control de temperatura. En relación a ello, Huang et al. (2019) señalan que mantener controlado dichos parámetros en los tratamientos experimentales, facilitan el crecimiento de las algas, lo cual a su vez favorece la eficiencia de remoción de estrógenos.

Al respecto, Hom et al. (2021) en su estudio: “Rendimiento de un fotobiorreactor de microalgas para el tratamiento de aguas residuales de inodoros: Eliminación de compuestos farmacéuticamente activos y recolección de biomasa”, señalan que puede existir valores de remoción de estrógenos en porcentajes que van desde el 30 a 57%, pudiendo corresponder a procesos iniciales de arranque en el tratamiento; esto debido al proceso de aclimatación de la microalgas en presencia del contaminante).

Por otro lado, Ruksrithong & Phattarapattamawong (2019) señalan que en concentraciones de 100 mg L<sup>-1</sup> peso seco de microalgas, se promueve remoción de estrógeno sintético en un promedio que va de 52% a 99%; siendo el principal mecanismo de eliminación de estrona y 17β-estradiol la biodegradación.

Es fundamental considerar que la eliminación de etinilestradiol, es atribuible a los procesos de autotrofia, fijación y biotransformación de carbono por presencia de microalgas; se observa que las eficiencias de remoción por *Chlorella* oscilan entre 65% y 92% respectivamente después de 10 días de contacto. Los efectos ecotoxicológicos evidenciados dependen de la concentración de contaminante y del tiempo transcurrido, presentándose pigmentación fotosintética en la *Chlorella* y algunos daños oxidativos (Huang et al., 2019).

Los valores obtenidos en los tratamientos T<sub>16R1</sub>, T<sub>20R2</sub>, T<sub>24R3</sub>; presentan una remoción promedio de etinilestradiol de 80,92%; pudiendo deberse a la concentración de etinilestradiol (4 mg L<sup>-1</sup>) y a la medición de mayor densidad poblacional de biomasa fresca de *Chlorella sp* (200 mg L<sup>-1</sup>), representado por  $4,0 \times 10^6$  cel mL<sup>-1</sup>. Al haber un

incremento de densidad poblacional, la remoción del etinilestradiol incrementó, en relación a la primera concentración poblacional.

En atención a ello; Hena et al. (2020) justifican que la remoción de contaminantes farmacéuticos de carácter estrógenos sintéticos, pueden presentar porcentajes de remoción entre 67 a 97%, influidos por microalgas en densidades poblaciones significativas, llevando a cabo tres importantes fases, como: La rápida adsorción, debido a las interacciones fisicoquímicas entre los contaminantes y la pared celular, seguido por la transferencia de carácter lento de moléculas a través de la pared celular., y finalmente terminado como bioacumulación o ambas.

Asimismo, tenemos lo mencionado por Huang et al. (2019) quienes precintan que en su investigación “Efectos ecotoxicológicos y eliminación de 17 $\beta$ -estradiol en algas *Chlorella*”, se observó en experimentos de laboratorio, los efectos ecotoxicológicos y los métodos de eliminación de 17 $\beta$ -estradiol en presencia de algas *Chlorella*; en porcentajes que van desde el 65% a 92%, después de los diez días de contacto, en condiciones de mayor densidad poblacional de algas.

Por otro lado, tenemos las aseveraciones de Ruksrithong & Phattarapattamawong (2019), quienes señalan que estos procesos de remoción de estrógenos, puede deberse a mecanismo de biodegradación, o procesos de adsorción (Esta última representando un valor minoritario). Tal y como señala Wang et al. (2019) sobre la degradación del estrógeno en lugar de la mera absorción o adsorción por microalgas; siendo estos procesos de importancia para recomendar que las microalgas podrían ser un tratamiento avanzado de aguas residuales para eliminar nutrientes y estrógenos.

Para los tratamientos T<sub>17R3</sub>, T<sub>22R2</sub>, T<sub>23R1</sub>; se evidenció una remoción promedio de etinilestradiol de 96,49%, pudiendo deberse a la mayor abundancia de la densidad poblacional de biomasa fresca de *Chlorella sp* (300 mgL<sup>-1</sup>), misma que alcanzó 4,9x10<sup>6</sup> cel mL<sup>-1</sup>; representando la mayor eficiencia encontrada.

Este nivel de remoción, puede deberse a los procesos de biodegradación, los cuales se ven facilitados por las condiciones óptimas de crecimiento y desarrollo de las microalgas. Al respecto, Neilson & Lewin (2020) señalan que los procesos de adsorción parecen ser una etapa previa a la biodegradación de algunos contaminantes; por otro lado, la

biodegradación de estrógenos por medio de microalgas tiene lugar de forma directa por los metabolitos heterótrofos; o mediante la acción de enzimas extracelulares.

En relación a ello, Vassalle et al. (2020) en su investigación “¿Se pueden utilizar estanques de algas de alta velocidad como postratamiento de reactores UASB, para eliminar los microcontaminantes?”; señalan que en tratamientos con caudales continuos de flujo constante y masa algal abundante; se puede evidenciar remoción de estrógeno E2 en valores porcentuales mayores a 85. Por otro lado, tenemos las aseveraciones hechas por Huang et al. (2019) en su investigación: “Efectos ecotoxicológicos y eliminación de 17 $\beta$ -estradiol en algas *Chlorella*”, quienes observaron en experimentos de laboratorio, los efectos ecotoxicológicos y las técnicas de remoción de 17 $\beta$ -estradiol en disposición de algas *Chlorella*; utilizando masa de alga seca en suspensión; señalando que, en periodos de 45 días de tratamiento, la eliminación de E2, se debe a los procesos de autotrofia, fijación y transformación de carbono por presencia de microalgas; evidenciándose eficiencias de remoción por *Chlorella* de 65% y 92%.

Parladé et al. (2018) en su investigación: “Efectos de las condiciones de cultivo sobre la eliminación de  $\beta$ -estradiol en fotobiorreactores de laboratorio y planta piloto por un consorcio de algas y bacterias que trata aguas residuales urbanas”; señalan que cuando existen condiciones óptimas para el desarrollo y crecimiento de la microalga, la eliminación del contaminante es casi completa; presentando eficiencias mayores o cercanas a 93,75%. Por otro lado, señalan que los ensayos de bioaumentación demostraron que el ingreso de biomasa adicional dio como resultado una mayor remoción general, lo cual disminuye el rendimiento por mg de biomasa.

Por otro lado; Kumar et al. (2020) señalan que el uso de microalgas representa un tratamiento eficaz para la biorremediación de los residuos orgánicos; simbolizando una tecnología rentable y sostenible para la economía biocircular si se alimentan de corrientes de desechos de otros subprocesos. Además, la biomasa de algas puede contener metabolitos de alto valor, incluidos ácidos grasos omega-3, pigmentos, aminoácidos y alto contenido de azúcar. Por lo tanto, después de la extracción de compuestos de alto valor, la biomasa residual puede convertirse directamente en energía mediante transformación termoquímica o puede utilizarse para producir biocombustibles mediante fermentación biológica o transesterificación” (Shahid et al., 2020).

Tenemos también lo mencionado por Norvill et al. (2019), quienes indican que los procesos de adsorción/absorción y biodegradación son los principales mecanismos de eliminación de los estrógenos; estos procesos dependen en gran magnitud de la estructura del compuesto presente (hidrofobicidad y grupos funcionales disponibles), de la especie de microalgas que ejercerá acción como adsorbente/absorbente y de las condiciones ambientales (pH y temperatura).

Como señalan Hena et al. (2020), estos productos farmacéuticos son microcontaminantes que, incluso en dosis bajas, puede inducir efectos fisiológicos en humanos y otros organismos del medio ambiente. Su estructura estable resiste la desintegración y consecuentemente induce a una mayor persistencia en el medio ambiente; por lo tanto, permanece biológicamente activo; representando una preocupación para las características ambientales.

Al respecto, Hom et al. (2019) menciona que los tratamientos actuales de aguas residuales no son suficientes para eliminar alguno de estos contaminantes; representando un grave problema, sumado a esto que no están reglamentados en ninguna normativa; es por ello que, las hormonas esteroides y sus análogos estructurales constituyen una preocupación ambiental crítica. Estos “estrógenos ambientales” pueden poner en peligro la reproducción y desarrollo de la fauna acuática, incluso a concentraciones muy bajas (nanogramos por litro) (Ayala, 2017).

Igualmente, Khan et al. (2020) citan, que los productos farmacéuticos están surgiendo como una importante fuente de contaminación en el ambiente. Observando que efluentes hospitalarios tiene una eminente cantidad de residuos de tipo químicos como antibióticos, desinfectantes y otros residuos de tratamientos; los efluentes farmacéuticos se caracterizan por ser bioactivos y se ha determinado que su existencia en el medio ambiente es perjudicial para el agua, los microorganismos acuáticos y para los seres humanos.

De Jesús (2020) manifiesta que la concentración en el ambiente de contaminantes emergentes; se debe especialmente por la disposición de las aguas residuales municipales. La presencia de estos contaminantes, a pesar de no ser significativa en términos de concentración, simbolizan un riesgo potencial para la salud. Se sabe que pueden generar interferencia el sistema endocrino y también se sospecha que pueden tener

incidencia en otras condiciones como cáncer, problemas de desarrollo neurológico, entre otras. Los contaminantes emergentes se pueden catalogar en dos principales grupos, que son productos farmacéuticos y de cuidado personal (PPCP) y disruptores endocrinos químicos (EDC). Se ha descubierto que los tratamientos de aguas residuales son sistemas convencionales son ineficaces para eliminar la mayoría de los contaminantes emergentes, por lo que se necesitan tratamientos de tipo avanzados para reducir su concentración en los efluentes de aguas residuales.

## CAPÍTULO V

### CONCLUSIONES

Se determinó una concentración de  $0,0034 \text{ mg L}^{-1}$  de etinilestradiol en el efluente de la planta de tratamiento de agua residual de Celendín, Cajamarca, Perú, 2021 – 2022.

Se determinó la remoción del etinilestradiol en el sistema de fotobiorreactores de tratamiento; evidenciándose nula degradación en los controles debido a que no estuvieron sometidos a las microalgas *Chlorella sp.*, en relación a los tratamientos con microalgas *Chlorella sp.*, la remoción se presentó en 82,68% promedio.

Se determinó una concentración de 7,00; 17,00 y 13,10  $\text{mg O}_2 \text{ L}^{-1}$  mínimo, máximo y promedio de oxígeno disuelto respectivamente. Los valores máximos son en donde fueron sometidos a aireación constante, facilitando los procesos de remoción de etinilestradiol, evitando que se precipiten o adhieran las microalgas a las paredes del fotobiorreactor. La temperatura óptima varió entre 22,00 y 24, 55 °C; valores de pH que oscilaron entre 6,8 a 7,50 y tiempo de retención de 5 días; los cuales facilitaron el crecimiento de las microalgas.

El efecto de la densidad poblacional de *Chlorella sp* en la remoción de etinilestradiol del efluente de la planta de tratamiento de agua residual de Celendín, Cajamarca, Perú, 2021 – 2022; es directamente proporcional. A mayor concentración de *Chlorella sp.*, mayor remoción de etinilestradiol. A una concentración de  $300 \text{ mg L}^{-1}$ , logró remover 96,49% de etinilestradiol; a  $200 \text{ mg L}^{-1}$  removi6 80,92% y a  $100 \text{ mg L}^{-1}$  de *Chlorella sp.*, un 70,65%.

## CAPÍTULO VI

### REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AINIA (2019). *Restos de antibióticos en aguas: El problema de los contaminantes emergentes*. <https://www.ainia.es/noticias/restos-de-antibioticos-en-aguas-el-problema-de-los-contaminantes-emergentes/#:~:text=Los%20contaminantes%20emergentes%20son%20compuestos,etapas%20del%20ciclo%20del%20agua>.
- Arbeláez, P. (2020). *Contaminantes emergentes en aguas residuales, de río y fangos de depuradora* (Tesis doctoral). Universidad de Rovira/Virgili. Tarragona.
- Ayala, M. (2017). *Estrógenos, contaminantes emergentes en cuerpos de agua*. Milenio. <https://www.milenio.com/cultura/estrogenos-contaminante-emergente-en-cuerpos-de-agua>.
- Azcárte, M. (2018). *Investigación documental: Importancia de la biodisponibilidad en el proceso de desarrollo de medicamentos* [Tesis para obtener el grado de Licenciado en farmacia]. <http://risisbi.uqroo.mx/bitstream/handle/20.500.12249/1604/RM301.25.2018-1604.pdf?sequence=1&isAllowed=y>.
- Banco Mundial. (2020). El agua residual puede generar beneficios para la gente, el medioambiente y las economías, según el Banco Mundial. <https://www.bancomundial.org/es/news/press-release/2020/03/19/wastewater-a-resource-that-can-pay-dividends-for-people-the-environment-and-economies-says-world-bank>.
- Barceló, D., y López, M. (2022). *Contaminación y calidad química del agua: el problema de los contaminantes emergentes*. <http://www.unizar.es/fnca/varios/panel/15.pdf>.
- Barrington, E. (2022, December 19). *hormone*. *Encyclopedia Britannica*. <https://www.britannica.com/science/hormone>.
- Beceril, J. (2012). *Optimización de metodologías analíticas para la determinación de contaminantes emergentes en aguas de abastecimiento y residuales*. Universidad de Santiago de Compostela. <http://minerva.usc.es/handle/10347/6150>.

- Bhola, R., Desikan, S., Santosh, K., Subburamu, E., Saaiyasi, F., y Bux, E. (2020). *Effects of parameters affecting biomass yield and thermal behaviour of Chlorella vulgaris*. J. Biosci. Bioeng. 111 (2011) 377–382. 10.1016/j.jbiosc.2010.11.006.
- Brennan, L., y Owende, P. (2020). *Biofuels from microalgae-A review of technologies for production, processing, and extractions of biofuels and co-products*. Renewable and Sustainable Energy Reviews 14(1), 557-577.
- Boxall, A. (2004). *Los efectos secundarios de la medicación en el ambiente*. EMBO Reports, 5 (12), 1110-1116.
- Candela, R. (2018). *Las microalgas y el tratamiento de aguas residuales: conceptos y aplicaciones. Una revisión bibliográfica*. Universidad Nacional Abierta y a Distancia - Ingeniería Ambiental. Bucaramanga. <https://repository.unad.edu.co/bitstream/handle/10596/12170/91541023.pdf?sequence=1&isAllowed=y>.
- Castillo, E. (2017). *Eficiencia de Lemna sp y Eichhornia crassipes, en la remoción de nutrientes del efluente de la planta de tratamiento de aguas residuales en Celendín*. Universidad Nacional de Cajamarca. <https://webcache.googleusercontent.com/search?q=cache:LPuoWWv3BVkJ:https://repositorio.unc.edu.pe/bitstream/handle/UNC/1735/TESIS%2520EISNER%2520WILL%2520CASTILLO%2520ROJAS%25202017.pdf%3Fsequence%3D1%26isAllowed%3Dy+%&cd=1&hl=es-419&ct=clnk&gl=pe>.
- Centro de las nuevas tecnologías del agua de Sevilla. (2018). *Manual de depuración de aguas residuales*. <http://alianzaporelagua.org/documentos/MONOGRAFICO3.pdf>.
- Chantima Ruksrithong & Songkeart Phattarapattamawong. (2017). *Eliminación de estrona y 17β-estradiol por cultivo de microalgas: cinética y mecanismos de eliminación*. Tecnología Ambiental, 40(2), 163-170. <http://dx.doi.org/10.1080/09593330.2017.1384068>.
- Checa, A. (2017). *Metabolismo de fármacos*. Conogasi. <http://conogasi.org/articulos/metabolismo-de-farmacos/>.
- Conectividad Educativa de Informática Básica para el Aprendizaje en Línea (2019). *Reino protista – Chlorella sp*. [https://contenidos.ceibal.edu.uy/fichas\\_educativas/\\_pdf/ciencias-naturales/reino-protista/002-chlorella-vulgaris.pdf](https://contenidos.ceibal.edu.uy/fichas_educativas/_pdf/ciencias-naturales/reino-protista/002-chlorella-vulgaris.pdf).
- Dávila, A., y Ramírez, J. (2019). *Impacto de estrógenos en el medio ambiente*. <https://invdes.com.mx/los-investigadores/impacto-estrogenos-medio-ambiente/>.



- De Jesús, C. (2020). *Tratamiento de aguas residuales para la eliminación de microcontaminantes emergentes*. DSPACE. <http://repository.usc.edu.co/handle/20.500.12421/4947>.
- Delgado, N. (2019). *Diagnóstico y remoción de contaminantes emergentes en aguas superficiales y cloacales* (Tesis doctoral). Universidad Nacional de La Plata. Chile.
- Dirección General de Salud Ambiental. (2020). Parámetros Organolépticos. Fichas Técnicas. [http://www.digesa.minsa.gob.pe/DEPA/informes\\_tecnicos/GRUPO%20DE%20USO%201.pdf](http://www.digesa.minsa.gob.pe/DEPA/informes_tecnicos/GRUPO%20DE%20USO%201.pdf).
- Djerassi, C. (2022). *Chemical birth of the pill*. *Obstet Gynecol.* 10.1016/j.ajog.2005.06.010.
- Escarpada, C. (2017). Biorremediación de aguas contaminadas con nutrientes y fármacos mediante microalgas. (Tesis doctoral, Universidad de León). <https://buleria.unileon.es/handle/10612/6773>.
- Evans, G. (2021). *Oral contraception*. *Med Clin North Am.* 3(1), 479 – 503. 10.1016/j.mcna.2015.01.004.
- Fernández, B., Mariño, E., Ávalos, M., y Baró V. (2021). *Información sobre anticoncepción y métodos anticonceptivos en adolescentes del municipio “La Lisa”*. SCIELO. *Revista Cubana de medicina general integral*, 29(1), 3-7. [http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0864-21252013000100002](http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0864-21252013000100002).
- Fernández, C. (2020). *Estudio sobre la incidencia de depresión en pacientes tratados con etonogestrel por vía oral o en implante subcutáneo*. Universidad de Coruña. Formato [PDF]. <https://ruc.udc.es/dspace/handle/2183/26154>.
- Fernández, J. (2020). *Ingeniería de procesos aplicada a la biotecnología de microalgas*. <https://w3.ual.es/~jfernand/ProcMicro70801207/tema-1---generalidades/1-2-cultivo-de-microalgas.html>
- Gaitán, O. (2019). *Evaluación ecotoxicológica del estradiol y sus metabolitos primarios liberados al ambiente, a través de la actividad ganadera*. (Tesis doctoral). Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo. Pachuca. México.
- García, A. (2019). *Los disruptores endocrinos: un problema para la salud de especies acuícolas. El caso del etinilestradiol*. <http://www.conama2016.org/web/generico.php?idpaginas=&lang=es&menu=405&id=1350&op=view&tipo=C>

- García, M., Arashiro, L., Santos, L., Insa, S., Rodríguez, S., Barceló, D., Ferrer, I., y Garfí, M. (2020). *Destino de los fármacos prioritarios y sus principales metabolitos y productos de transformación en sistemas de tratamiento de aguas residuales a base de microalgas*. ELSEVIER. Diario de materiales peligrosos. 390(1), 127-771. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2019.121771>.
- Gattullo, C., Bährs, H., Steinberg, C., & Loffredo, E. (2022). *Eliminación del bisfenol A por el alga verde de agua dulce *Monoraphidium braunii* y el papel de la materia orgánica natural*. Entorno total, 416:501-506.
- 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.
- Gómez, C., Morales, M., Acién, F., Escudero, R., Fernández, J., & Molina, E. (2021). *Utilization of secondary treated wastewater for the production of freshwater microalgae*. *Appl. Microbiol. Biotech.* 99, 6391-6944.
- Grdulska, A., y Kowalik, R. (2020). *Productos farmacéuticos en agua y aguas residuales: descripción general*. *Environment*, 12(2), 79-84. 10.30540 / sae-2020-009.
- Guamán, M., y Gonzáles, N. (2019). *Catálogo de microalgas y cianobacterias de agua dulce del Ecuador. Biodiversidad de los principales géneros de microalgas y cianobacterias encontradas en sistemas lacustres de áreas protegidas de los andes y Amazonía del Ecuador*. Corporación para la investigación energética [Archivo PDF]. <http://energia.org.ec/cie/wp-content/uploads/2017/09/Catlogo-de-Microalgas-y-Cianobacterias-del-Ecuador.pdf>.
- Hena, S., Gutierrez, L., y Croué, J. (2020). *Eliminación de productos farmacéuticos y de cuidado personal (PPCP) de las aguas residuales utilizando microalgas: una revisión*. ELSEVIER. Diario de materiales peligrosos, 403(1), 124-401. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2020.124041>.
- Hernández Sampieri, R. (2014). *Metodología de la investigación*. Editorial Mc Graw Hill Education. <https://www.uca.ac.cr/wp-content/uploads/2017/10/Investigacion.pdf>.
- Hernández, A., y Labbé, J. (2021). *Microalgas, cultivo y beneficios*. *Revista de biología marina y oceanografía*, 49(2), 157-173. 10.4067/S0718-19572014000200001
- Hom, A., Jaén, A., Bello, I., Rodríguez, S. Vicent, S., Barceló, D., y Blánquez, P. (2021). *Rendimiento de un fotobiorreactor de microalgas para el tratamiento de aguas residuales de inodoros: eliminación de compuestos farmacéuticamente activos y*

- recolección de biomasa*. ELSEVIER. *Ciencia del medio ambiente total*, 592 (1), 1-11. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2017.02.224>.
- Hom, A., Llorca, M., Rodríguez, S., Vicent, T., Barceló, D. & Blánquez, P. (2019). *Microalgae cultivation on wastewater digestate:  $\beta$ -estradiol and 17 $\alpha$ -ethynylestradiol degradation and transformation products identification*. *J. Environ. Manag.* 155:106-113.
- Houtman, C., Legler, J., & Thomas, K. (2019). *Effect-Directed Analysis of Endocrine Disruptors in Aquatic Ecosystems*. Berlin Heidelberg: Springer-Verlag. 237-265.
- Huang, B., Tang, J., He, H., Gu, L., y Pan, X. (2019). *Efectos ecotoxicológicos y eliminación de 17 $\beta$ -estradiol en algas *Chlorella**. ELSEVIER. *Revista de ecotoxicología y seguridad ambiental*, 174(1), 377-383. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2019.01.129>.
- iAgua Magazine. (2020). *Tratamiento de Aguas: La tecnología busca financiación*. <https://www.iagua.es/magazine/4>.
- Infante, C., Angulo, E., Zárate, A., Florez, J., Barrios, F., y Zapata, C. (2022). *Propagación de la microalga *Chlorella* sp. En cultivo por lote: Cinética del crecimiento celular*. Redalyc.org, 3(2), 159-164. <https://www.redalyc.org/pdf/3236/323627686016.pdf>.
- Johnson, A., & Chen, Y. (2020). *Estimating steroid estrogen inputs into activated sludge treatment works and observations on their removal from the effluent*. *Sci. Total Environ.* 256, 163 – 173.
- Jun, C., Quing, Y., Ke, L., Jianzhong, L. y Junhu, Z. (2017). *Eliminación de etinilestradiol de las aguas residuales mediante la mutación de microalgas *Chlorella* PY-ZUI con fijación de CO<sub>2</sub>*. ELSEVIER. *Tecnología bioambiental*, 249(1), 284-289. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2017.10.036>.
- Kalyva, M. (2017). *El destino de los productos farmacológicos en el entorno*. *Departamento de ecología y ciencias ambientales*. Universidad de Suecia. 08,15. <https://umu.diva-portal.org/smash/get/diva2:1085088/FULLTEXT01.pdf>.
- Kasonga, T., Coetzee, M., Kamika, I., Ngole.Jeme, V., Ndombo, M., Momba, B. (2020). *Productos químicos disruptores endocrinos como contaminantes de preocupación emergentes en aguas residuales y aguas superficiales: Una revisión*. ELSEVIER. *Revista de Gestión Ambiental*. 277(1), 111 – 485. <https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2020.111485>.

- Khan, N., Ullah, S., Ahmed, S., Haq, I., Yousefi, M., Akbar, A., y Changani, F. (2020). *Tendencias recientes en tecnologías de eliminación y tratamiento de contaminantes emergentes: una revisión crítica*. ELSEVIER. *Tendencias en química analítica*, 122(1), 115-744. <https://doi.org/10.1016/j.trac.2019.115744>.
- Kumar, A., Young, Y., y Jun, S. (2020). *Perspectivas emergentes de microalgas mixotróficas: camino a seguir hacia un bioproceso sostenible para la remediación ambiental y biocombustibles rentables*. ELSEVIER. *Tecnología bioambiental*. 1(1), 122-741. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2020.122741>.
- Kumar, V., Abbas, A., Aster, J. (2019). *Respuestas celulares al estrés y las agresiones tóxicas: adaptación, lesión y muerte*. Medlineplus. <https://medlineplus.gov/spanish/ency/article/002258.html>.
- Kümmerer, K. (2009). *La presencia de productos farmacéuticos en el medio ambiente debido al uso humano, los conocimientos actuales y futuros desafíos*. *Diario de la gestión ambiental*, 90 (8), 2354-2366.
- Le, J. (2019). *Metabolitos de los fármacos. Manuales MSD, versión para profesionales*. <https://www.msmanuals.com/es-pe/professional/farmacolog%C3%ADa-cl%C3%ADnica/farmacocin%C3%A9tica/metabolismo-de-los-f%C3%A1rmacos>.
- Lezcano, C. (2019). *Biotechnología ambiental de aguas y aguas residuales (Segunda edición)*. Editorial ECOE. [https://elibro.net/es/ereader/bibliounach/122526?as\\_all=aguas\\_\\_residuales\\_\\_definici%C3%B3n&as\\_all\\_op=unaccent\\_\\_icontains&prev=as](https://elibro.net/es/ereader/bibliounach/122526?as_all=aguas__residuales__definici%C3%B3n&as_all_op=unaccent__icontains&prev=as).
- Li, C., Wei, Y., Zhang, S., y Tan, W. (2020). *Métodos avanzados para analizar estrógenos esteroideos en muestras ambientales*. Springer. *Letras de química ambiental*, 18(1) 543 – 559. <https://doi.org/10.1007/s10311-019-00961-2>.
- Linch, S. (2019). *Introducción a los fármacos*. Manuales MSD. <https://www.msmanuals.com/es-pe/hogar/f%C3%A1rmacos/introducci%C3%B3n-a-los-f%C3%A1rmacos/introducci%C3%B3n-a-los-f%C3%A1rmacos>.
- Liyun, G., Huanhuan, D., Feng, W., & Nansheng, D. (2018). *Photodegradation promoted by microalgae of two endocrine disruptors in aqueous solutions*. Society of Chemical Industry. 10.1002/jctb.2043.
- López, S., Facundo, f., y Moroña, L. (2021). *Aislamiento, identificación y cultivo de *Chlorella vulgaris* con potencial para suplemento nutricional de peces*.

316675217\_Aislamiento\_identificacion\_y\_cultivo\_de\_Chlorella\_vulgaris\_con\_potencial\_para\_suplemento\_nutricional\_de\_peces.

- Lozano, A. (2020). *Efectos de tres tipos de difusores de aire comprimido sobre la capacidad de oxigenación en aguas residuales domésticas – Huancayo*. [Tesis de maestría, Universidad del Centro del Perú,]. [https://repositorio.uncp.edu.pe/bitstream/handle/20.500.12894/6424/T010\\_70041324\\_M.pdf?sequence=1](https://repositorio.uncp.edu.pe/bitstream/handle/20.500.12894/6424/T010_70041324_M.pdf?sequence=1).
- Mackulak, T., Ceransky, S., Fehér, M., Birosová, L., y Gál, M. (2019). *Productos farmacéuticos, fármacos y microorganismos resistentes: impacto ambiental en la salud de la población*. ELSEVIER. Opinión actual en ciencias ambientales y salud, 9(1), 40-48. <https://doi.org/10.1016/j.coesh.2019.04.002>.
- Martínez L. (2018). *Eliminación de CO<sub>2</sub> con microalgas autóctonas*. Tesis Doctoral, Instituto de Recursos Naturales, Universidad de León. <https://dialnet.unirioja.es/servlet/tesis?codigo=26675>
- Marwa, A. (2021). Adsorption Phenomena: Definition, Mechanisms, and Adsorption Types: Short Review. *Green and Applied Chemistry*. 13(1), 43-51. 10.48419/IMIST-PRSM/rhazes-v13.28283.
- Meneses, M. (2018). *Sin control poblacional continuará el daño medio ambiental en México. Dirección General de comunicación Social*. Universidad Nacional Autónoma de México. [https://www.dgcs.unam.mx/boletin/bdboletin/2018\\_204.html](https://www.dgcs.unam.mx/boletin/bdboletin/2018_204.html).
- Miazek, K., & Brozek, B. (2019). Effect of PHRs and PCPs on Microalgal Growth, Metabolism and Microalgae-Based Bioremediation Processes: A Review. *International Journal of Molecular Sciences*. 20(10), 24-92. 10.3390/ijms20102492.
- Ministerio de Salud. (s/f). *Etinilestradiol + Levonorgestrel*. [http://www.digemid.minsa.gob.pe/UpLoad/UpLoaded/PDF/Etinilestradiol\\_Levonorgestrel.pdf](http://www.digemid.minsa.gob.pe/UpLoad/UpLoaded/PDF/Etinilestradiol_Levonorgestrel.pdf).
- Montoya, C., y Acosta, A. (2021). Crecimiento de *Tetraselmis* sp. Empleando fertilizante como medio de cultivo. *Revista Scielo*. 34(2), 53-108. <https://doi.org/10.18273/revion.v34n2-2021005>.
- Muñoz, R., & Guleysse, B. (2018). *Algal-bacterial processes for the treatment of hazardous contaminants: A review*. *Water Res*. 40, 2799-2815.
- Neilson, A., & Lewin, R. (2020). *The uptake and utilization of organic carbon by algae: an essay in comparative biochemistry*. *Phycologia* 13, 227-264.

- Norvill, Z., Shilton, A., & Guieysse, B. (2019). *Emerging contaminant degradation and removal in algal wastewater treatment ponds: Identifying the research gaps*. *J. Hazard. Mater.* 313, 291-309.
- Olmedo, V. (2019). *Carbohidratos y proteínas en microalgas: potenciales alimentos funcionales*. *SCIELO*. 22(1). <https://doi.org/10.1590/1981-6723.04319>.
- Organismo de Evaluación y Fiscalización Ambiental. (2022). *Fiscalización ambiental en aguas residuales*. [https://www.oefa.gob.pe/?wpfb\\_dl=7827](https://www.oefa.gob.pe/?wpfb_dl=7827).
- Organización Mundial de la Salud. (2017). *Las consecuencias de la contaminación ambiental: 1,7 millones de defunciones infantiles anuales*. [https://www.paho.org/per/index.php?option=com\\_content&view=article&id=3692:las-consecuencias-de-la-contaminacion-ambiental-1-7-millones-de-defunciones-infantiles-anuales-segun-la-oms&Itemid=900](https://www.paho.org/per/index.php?option=com_content&view=article&id=3692:las-consecuencias-de-la-contaminacion-ambiental-1-7-millones-de-defunciones-infantiles-anuales-segun-la-oms&Itemid=900).
- Parladé, E., Hom, A., Blaánquez, P., Martínez, M., Vicent, T., y Gaju, N. (2018). *Efectos de las condiciones de cultivo sobre la eliminación de  $\beta$ -estradiol en fotobiorreactores de laboratorio y planta piloto por un consorcio de algas y bacterias que trata aguas residuales urbanas*. *ELSEVIER. Investigación del agua*, 137(1), 86-96. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2018.02.060>.
- Pérez, E. y Camacho, L. (2021). *Tecnología para el tratamiento de aguas servidas*. <http://cdigital.uv.mx/bitstream/123456789/29490/1/PerezAlarconyCamachoAlcala.pdf>.
- Petrovic, M., Radjenovic, J., Postigo, C., Kuster, M., Farre, M., De Alda, M., & Barceló, D. (2021). *Emerging Contaminants in Wastewaters: Sources and Occurrence* (pág. 1-35).
- Pubchem (2019). *Ethinylestradiol*. Biblioteca Nacional de Medicina - Centro Nacional de Información Biotecnológica). <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Ethinyl-estradiol>.
- Quispe, B., y Azabache, Y. (2022). *Relación del proceso de sedimentación de sólidos totales del agua residual y el estado de las redes de alcantarillado pluvial, Moyobamba*. *Revista Amazónica de Ciencias Ambientales y Ecológicas*, 1(1), 1-50. <https://revistas.unsm.edu.pe/index.php/reacae/issue/view/30/43>.
- Ramírez, I., Martínez, P., Quiroz, M., y Bandala, E. (2018). *Efectos de los estrógenos como contaminantes emergentes en la salud y el ambiente*. *Scielo. Tecnología y ciencias del agua*. 6, 3-5.

- Ratán, S. (2019). *Los impactos epigénéticos de los disruptores endocrinos en la reproducción femenina a lo largo de generaciones*. OXFORD ACADEMIC. *Biología de la reproducción*, 101(3), 635-644. <https://doi.org/10.1093/biolre/ioz081>.
- Robles, J., Sacramento, J., Ruíz, A., Baz, S., Canedo, Y., y Narváez, A. (2019). *Evaluación de crecimiento celular, remoción de nitrógeno y producción de lípidos por Chlorella vulgaris a diferentes condiciones de aireación en dos tipos de fotobiorreactores anulares*. Redalyc. *Revista Mexicana de ingeniería química*, 15(2), 361-377. <https://www.redalyc.org/pdf/620/62046829006.pdf>.
- Rodríguez, I. (2010). *Morfofisiología IV – Hormonas*. <http://uvsfajardo.sld.cu/sites/uvsfajardo.sld.cu/files/hormonas.pdf>.
- Romero, J. (2004). *Tratamiento de aguas residuales. Teoría y principio de diseño*. <https://es.scribd.com/document/359898671/Tratamiento-de-Aguas-Residuales-J-Romero-pdf>.
- Ruksrithong, Ch., & Phattarapattamawong, S. (2019). Removals of estrone and 17 $\beta$ -estradiol by microalgae cultivation: kinetics and removal mechanisms. *National Library of Medicine*. 40(2), 163-170. 10.1080/09593330.2017.1384068.
- Salgueiro, J. (2018). *Cultivo de microalgas en aguas residuales y aprovechamiento energético de la biomasa algal*. (Tesis doctoral). Universidad de Vigo. España.
- Santos, A., Gonzáles, Y., y Martín, C. (2018). *Uso y aplicaciones potenciales de las microalgas*. <https://www.iit.comillas.edu/docs/IIT-14-027A.pdf>.
- Shahid, A., Malik, S., Zhu, H., Xu, J., Zohaib, M., Nawaz, S., Asraful, M., y Aamer, M. (2020). *Cultivar microalgas en aguas residuales para la producción de biomasa, eliminación de contaminantes y mitigación del carbono atmosférico; una revisión*. ELSEVIER. *Ciencia del medio ambiente total*. 704 (1), 135-303. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2019.135303>.
- Spindola, C., Bassin, J., y Silva, R. (2018). *Contaminación del agua por disruptores endocrinos: impactos, aspectos microbiológicos y tendencias para la protección ambiental*. ELSEVIER. *Contaminación ambiental*, 235(1), 546-559. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2017.12.098>.
- Suh, I., y Lee, C. (2022). *Photobioreactor engineering: Design and performance*, *Biotechnol. Bioprocess Eng.* 8, 313–321. 10.1007/BF02949274.

- Tejada, L., Henao, D., Alvear, M., y Castillo, C. (2019). *Caracterización y perfil lipídico de aceites de microalgas*. Scielo.org, 24(39), 43-54. <http://www.scielo.org.co/pdf/rfing/v24n39/v24n39a05.pdf>.
- Tejedor, C. (2021). *Biotransformación*. Universidad de Alcalá. Formato [PDF]. [http://www3.uah.es/bioquimica/Tejedor/bioquimica\\_ambiental/T6\\_biotranspagina.pdf](http://www3.uah.es/bioquimica/Tejedor/bioquimica_ambiental/T6_biotranspagina.pdf).
- The American Society of Health-System Pharmacists - ASHP. (2017). *Pharmacists*. <https://www.ashp.org/>
- Urbano, T. (2019). Cultivo de microalgas. Agrotendencia. <https://agrotendencia.tv/agropedia/el-cultivo-de-microalgas/>.
- Vassalle, L., García, M., Aquino, S., Cássia, R., Ferrer, I., Passos, F., y Mota, C. (2020). *¿Se pueden utilizar estanques de algas de alta velocidad como postratamiento de reactores UASB, para eliminar los microcontaminantes?.* ELSEVIER. Quimiosfera, 248(1), 125-969. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2020.125969>.
- Voisin, A., Kültz, D., y Silvestre, F. (2019). *La exposición temprana al disruptor endocrino 17- $\alpha$ -etinilestradiol induce efectos retardados en los proteomas del cerebro, hígado y ovotestis adultos de un pez que se autofecunda*. ELSEVIER. Revista de proteómica, 194(1), 112-124. <https://doi.org/10.1016/j.jprot.2018.12.008>.
- Wang, Y., Sun, Q., Wang, H., Wu, K., y Yu, C. (2019). *Biotransformación de estrona, 17 $\beta$ -estradiol y 17 $\alpha$ -etinilestradiol por cuatro especies de microalgas*. ELSEVIER. Ecotoxicología y seguridad ambiental, 180 (1), 723-732. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2019.05.061>.
- Yáñez, S. (2018). *Influencia del pH en la eficiencia del tratamiento de aguas residuales en humedales construidos de flujo vertical*. Universidad de Coruña. [https://ruc.udc.es/dspace/bitstream/handle/2183/20315/YanezTorrente\\_Sandra\\_TFG\\_2018.pdf?sequence=1#:~:text=El%20pH%20var%C3%ADa%20de%203.5,et%20al.%2C%202015\).&text=Tabla%201.2%20%7C%20Caracterizaci%C3%B3n%20de%20las%20aguas%20residuales%20de%20una%20Bodega](https://ruc.udc.es/dspace/bitstream/handle/2183/20315/YanezTorrente_Sandra_TFG_2018.pdf?sequence=1#:~:text=El%20pH%20var%C3%ADa%20de%203.5,et%20al.%2C%202015).&text=Tabla%201.2%20%7C%20Caracterizaci%C3%B3n%20de%20las%20aguas%20residuales%20de%20una%20Bodega).
- Yien, T., Mangala, S., Zaharain, A., Norkhadajah, S., y Rasdi, I. (2019). *Cuantificación de hormonas esteroideas seleccionadas (17 $\beta$ -Estradiol y 17 $\alpha$ -Etinilestradiol) en plantas de tratamiento de aguas residuales en Klang Valle (Malasia)*. ELSEVIER. Quimiosfera, 215(1), 153-162. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2018.10.032>.



## CAPÍTULO VII

### ANEXOS

**Figura 9**

*Recolección del agua residual*



Nota. Efluente de la PTAR - Celendín

## **Figura 10**

### *Instalación del experimento*



Nota. Se añadió agua residual a las probetas iniciando el experimento

## **Figura 11**

### *Verificación del sistema de aireación*



Nota. Se instaló el sistema de aireación.

## Figura 12

*Dilución del etinilestradiol con metanol*



Nota. 4 mg de etinilestradiol + 1mL de metanol

## Figura 13

*Adición del etinilestradiol diluido a cada fotobiorreactor*



Nota. Una vez diluido el etinilestradiol se añadió a cada fotobiorreactor experimental.

**Figura 14**

*Preparación de muestra para envío al laboratorio*



Nota. Ph y OD

**Figura 15**

*Filtrado del sobrenadante posterior al centrifugado*



Nota. Se extrajo 4 mL de sobrenadante

### **Figura 16**

*Adición de 1mL de metanol*



Nota. Al sobrenadante, se adicionó 1 ml de metanol (Previamente filtrado)

### **Figura 17**

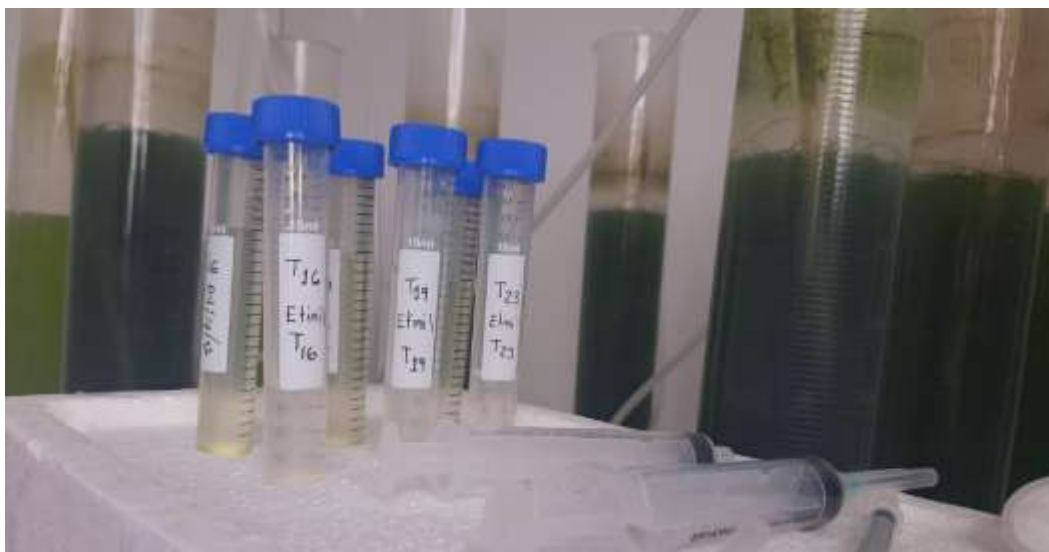
*Agitación de las muestras*



Nota. Se agitó suavemente la muestra a fin de homogenizarla.

### Figura 18

*Muestras listas para envío*



Nota. Se rotularon las muestras para ser enviadas al laboratorio.

### Figura 19

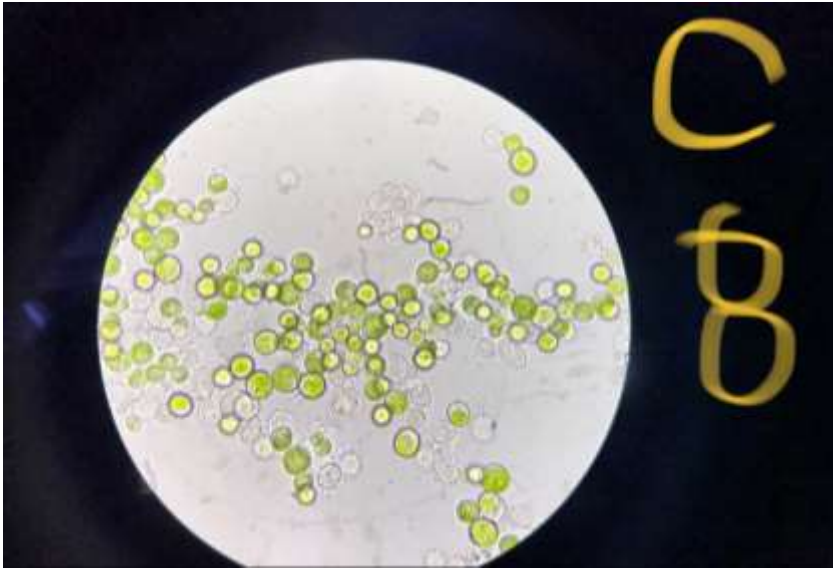
*Diferencias en el color – probetas del experimento*



Nota. A los diez días de tratamiento, se evidenció cambios en la coloración de las microalgas.

**Figura 20**

*Microalga Chlorella sp.*



Nota. Vista de la microalga *Chlorella sp.*, mediante microscopio

**Figura 21**

*Preparación del agua acidificada para el cromatógrafo*



Nota. Preparación de agua acidificada en el laboratorio de la Universidad Peruana Cayetano Heredia – Dr. León Villegas.

**Figura 22**

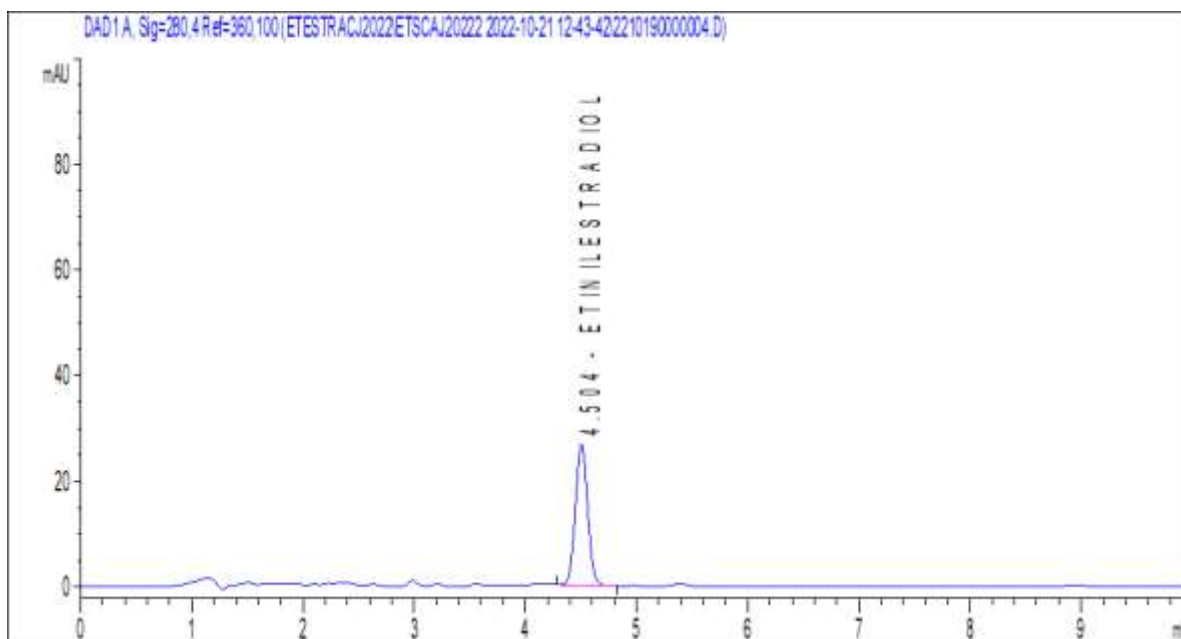
*Filtrado al vacío de acetonitrilo y metanol para cromatógrafo*



Nota. Insumos de la fase móvil del cromatógrafo

**Figura 23**

*Cromatograma del estándar de Etinilestradiol*

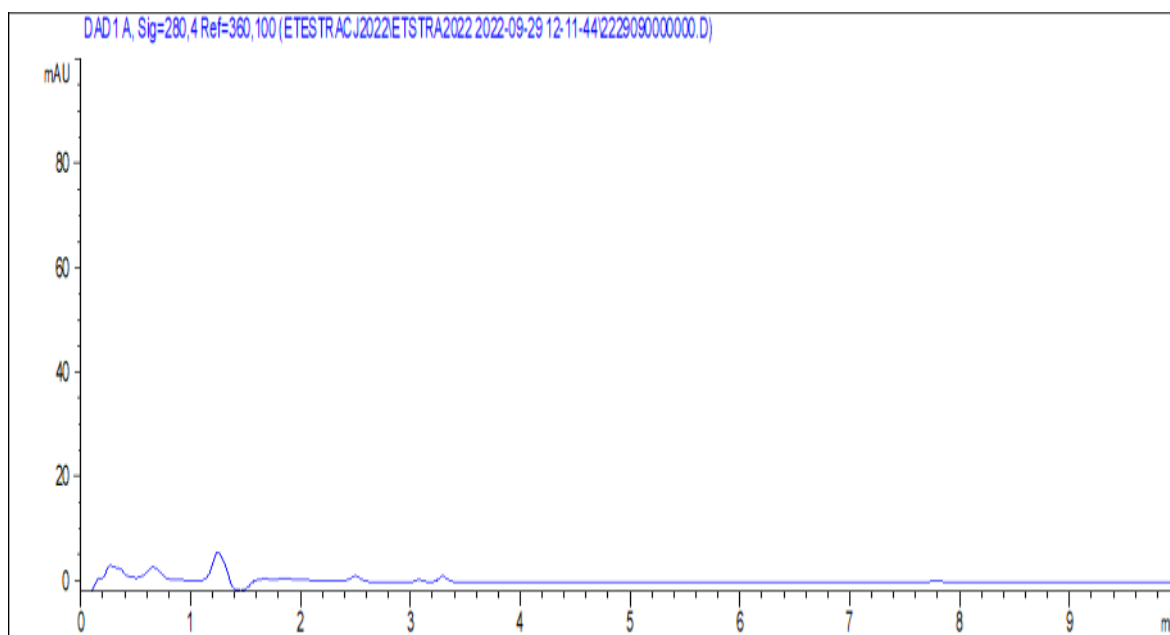


Nota. Análisis de linealidad



### Figura 24

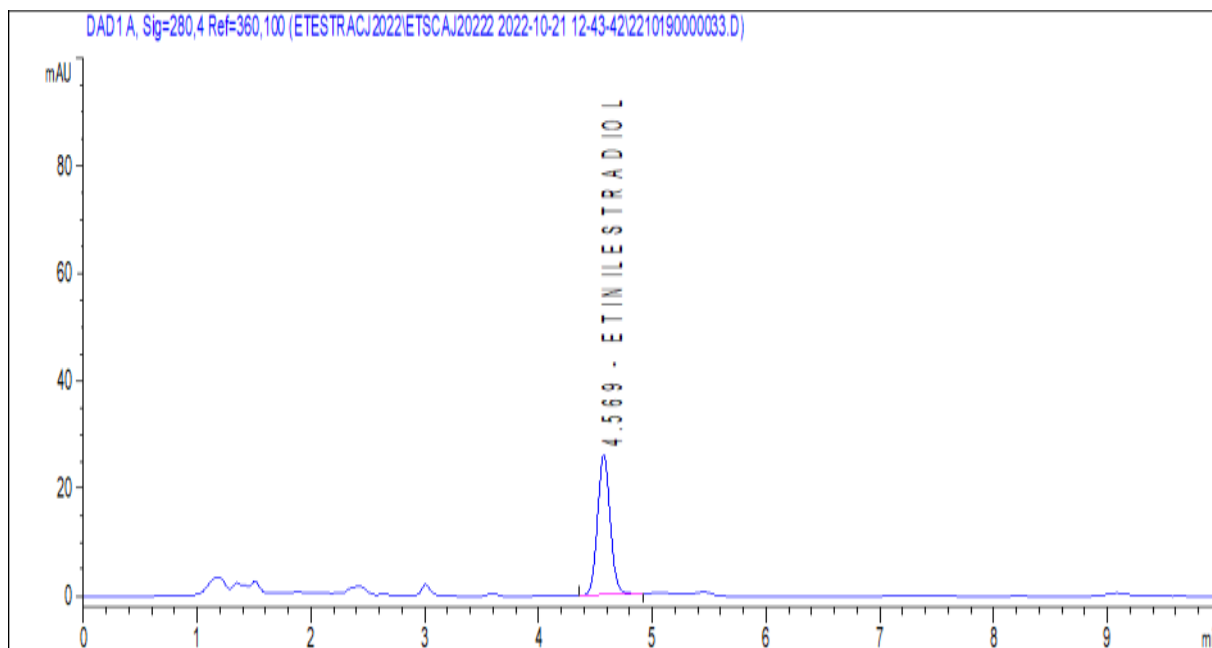
*Cromatograma del blanco, agua residual sin enriquecer con solución de estándar de Etinilestradiol*



*Nota. Análisis de recuperación*

### Figura 25

*Cromatograma - muestra de agua residual enriquecidas con Etinilestradiol 4,25 ug mL<sup>-1</sup>.*

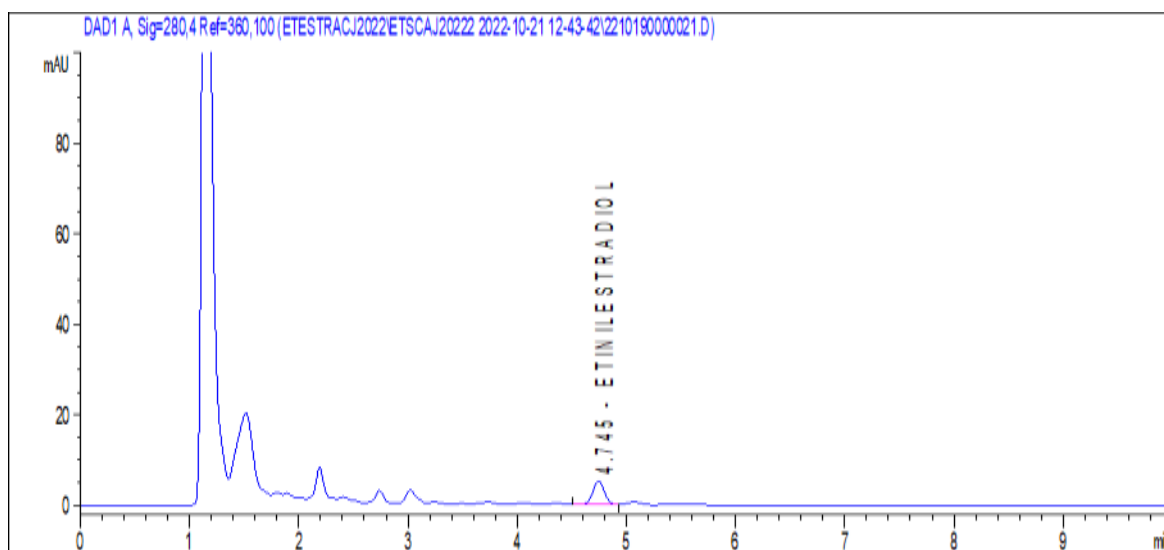


*Nota. Análisis de recuperación*

Los cromatogramas de los diferentes tratamientos se muestran a continuación:

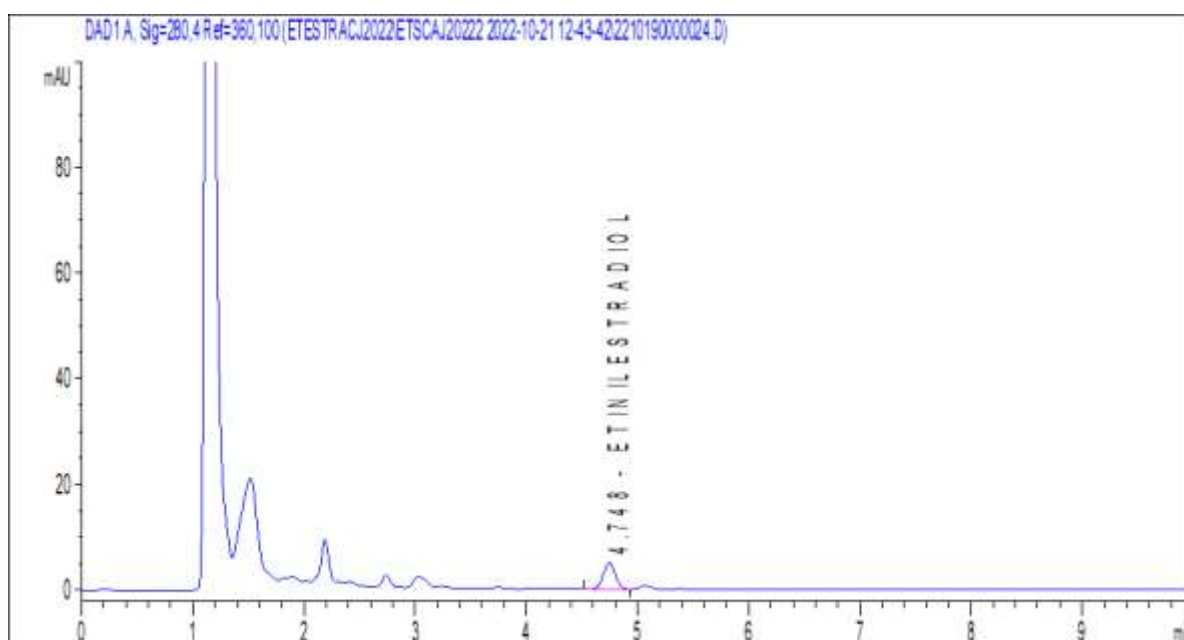
**Figura 26**

*Cromatograma de la muestra T18: Agua residual con 100 mL L<sup>-1</sup> de microalgas Chlorella sp + 4 mg Etinilestradiol Litro<sup>-1</sup>*



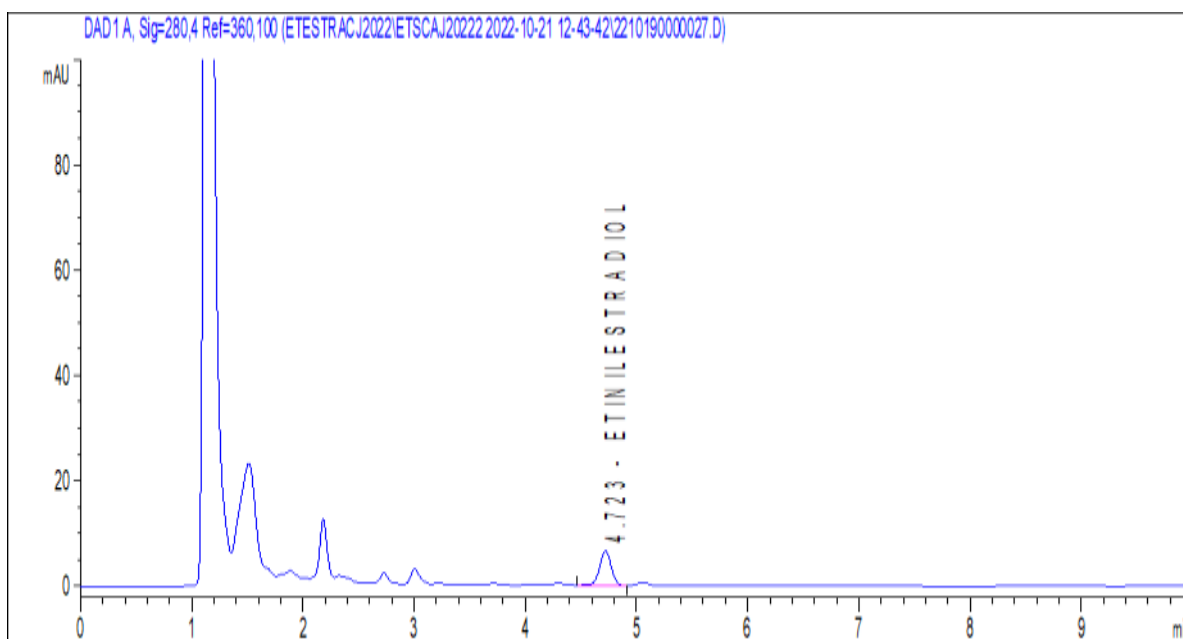
**Figura 27**

*Cromatograma de la muestra T19: Agua residual con 100 mL L<sup>-1</sup> de microalgas Chlorella sp + 4 mg Etinilestradiol Litro<sup>-1</sup>*



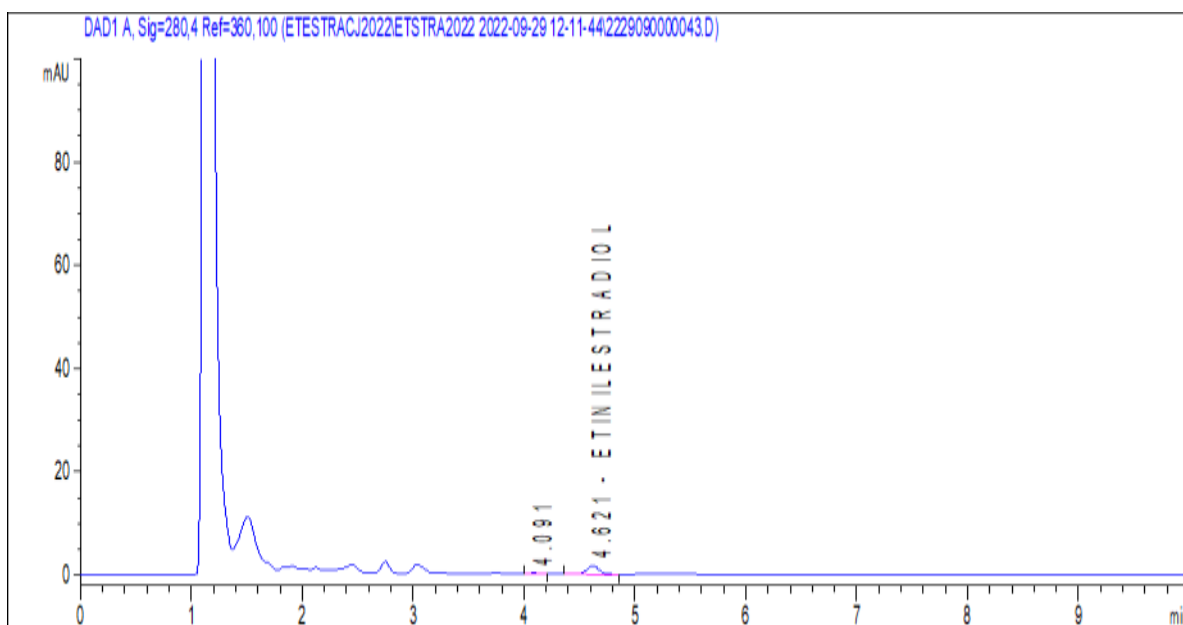
### Figura 28

Cromatograma de la muestra T21: Agua residual con 100 mL L<sup>-1</sup> de microalgas *Chlorella sp* + 4 mg Etinilestradiol Litro<sup>-1</sup>



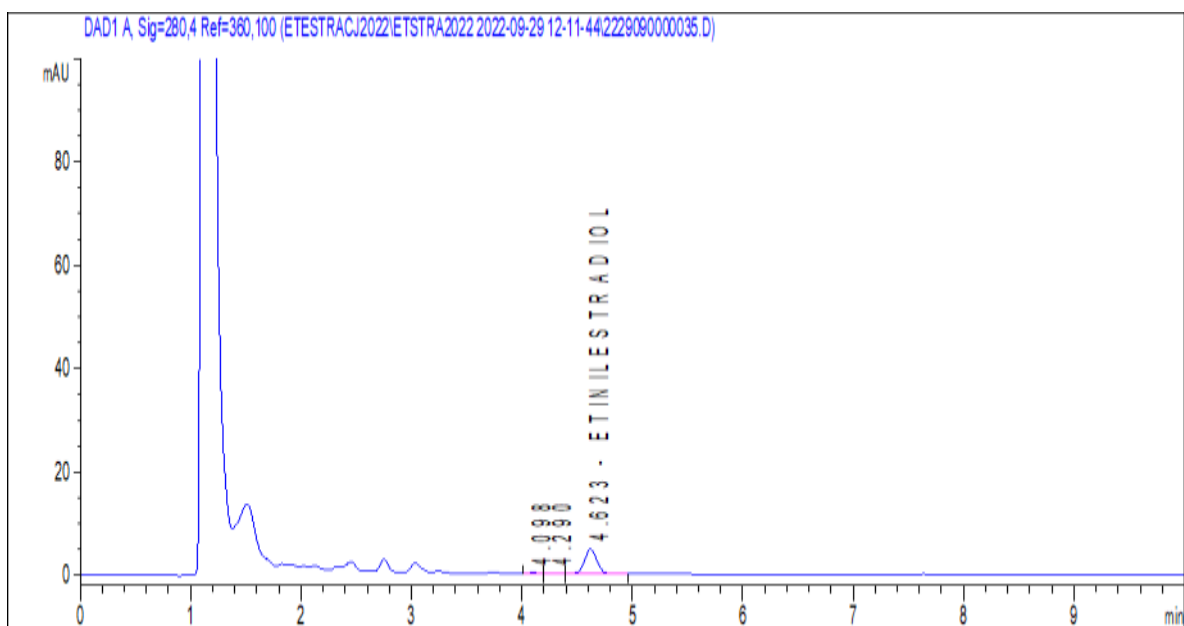
### Figura 29

Cromatograma de la muestra T16: Agua residual con 200 mL L<sup>-1</sup> de microalgas *Chlorella sp* + 4 mg Etinilestradiol Litro<sup>-1</sup>



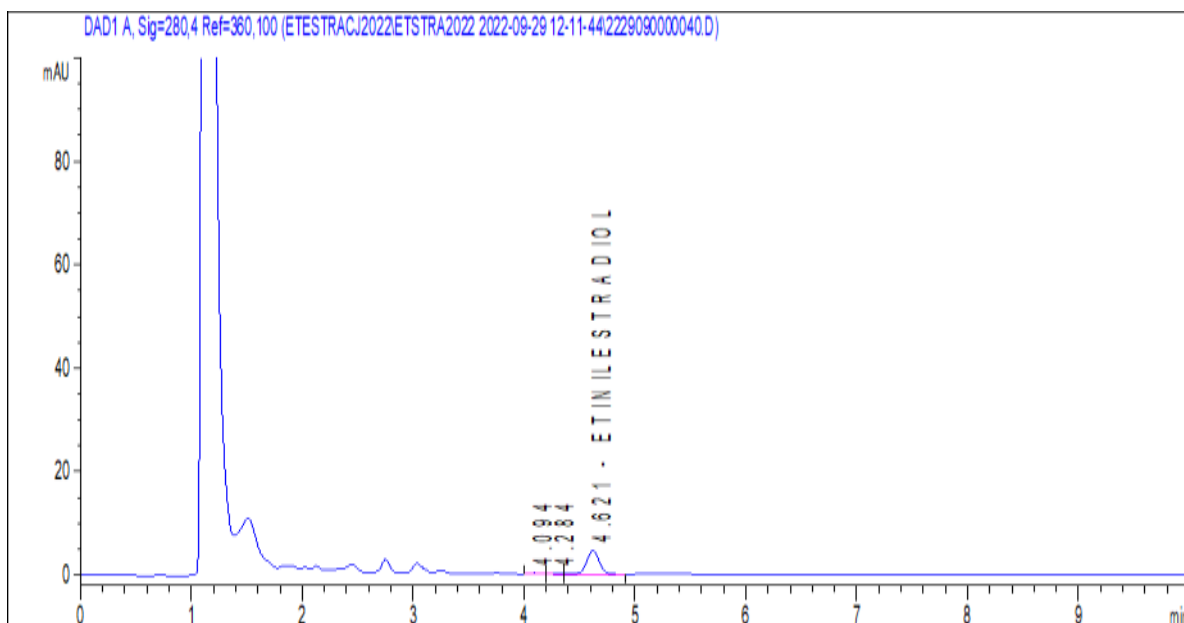
**Figura 30**

*Cromatograma de la muestra T20: Agua residual con 200 mL L<sup>-1</sup> de microalga Chlorella sp + 4 mg Etinilestradiol Litro<sup>-1</sup>*



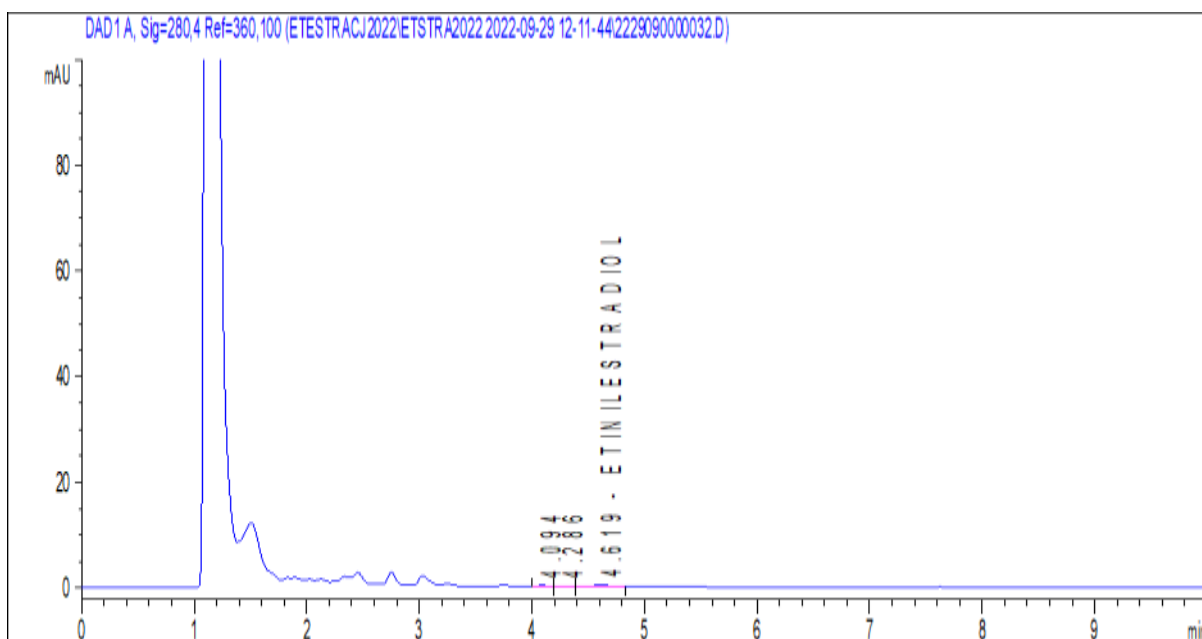
**Figura 31**

*Cromatograma de la muestra T24: Agua residual con 200 mL L<sup>-1</sup> de microalgas Chlorella sp + 4 mg Etinilestradiol Litro<sup>-1</sup>*



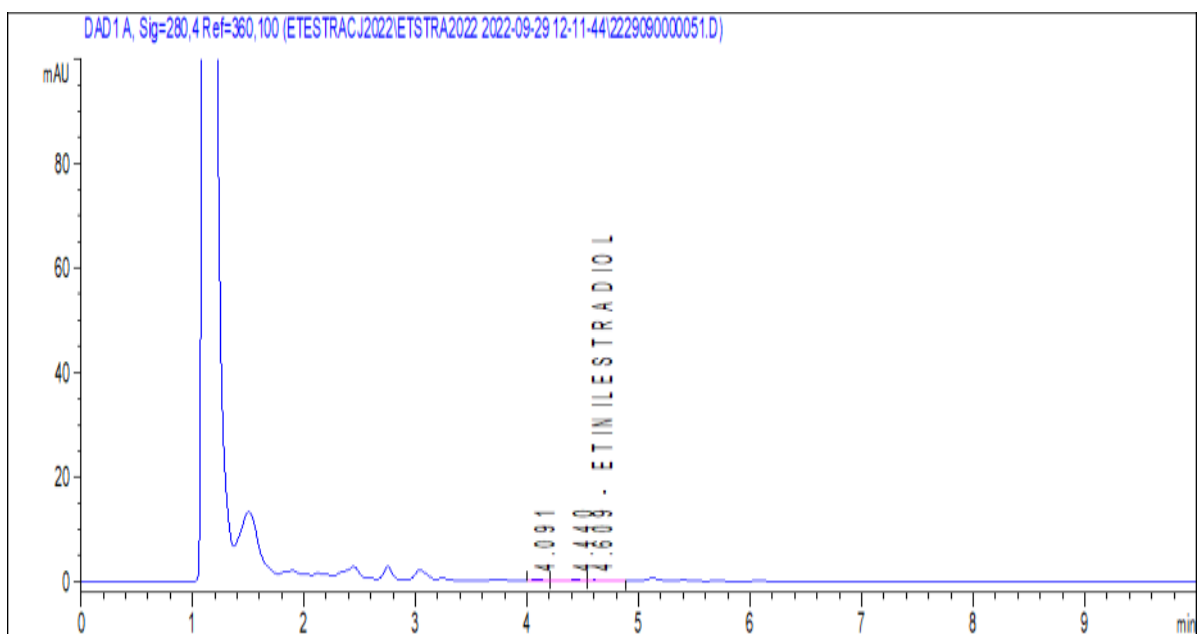
**Figura 32**

*Cromatograma de la muestra T17: Agua residual con 300 mL L<sup>-1</sup> de microalgas Chlorella sp + 4 mg Etinilestradiol Litro<sup>-1</sup>*



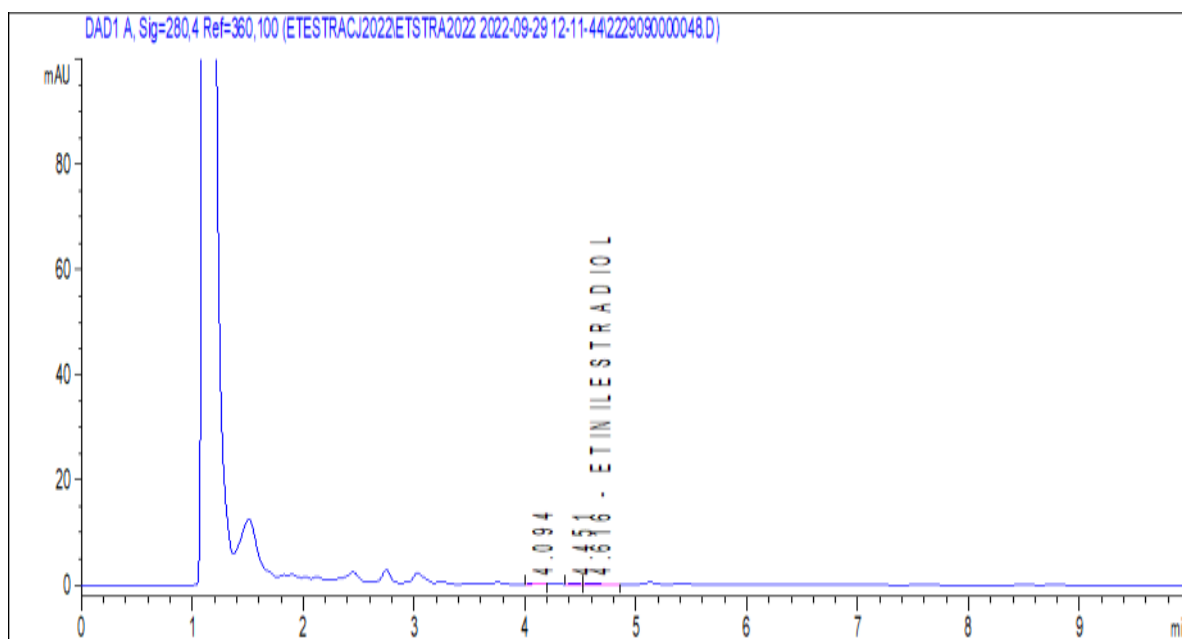
**Figura 33**

*Cromatograma de la muestra T22: Agua residual con 300 mL L<sup>-1</sup> de microalgas Chlorella sp + 4 mg Etinilestradiol Litro<sup>-1</sup>*



**Figura 34**

*Cromatograma de la muestra T23: Agua residual con 300 mL L<sup>-1</sup> de microalgas  
Chlorella sp + 4 mg Etinilestradiol Litro<sup>-1</sup>*



## Figura 35

Certificado de análisis del etinilestradiol – Sigma Aldrich

**SIGMA-ALDRICH®**

[sigma-aldrich.com](http://sigma-aldrich.com)

3050 Spruce Street, Saint Louis, MO 63103, USA

Website: [www.sigmaaldrich.com](http://www.sigmaaldrich.com)

Email USA: [techserv@sial.com](mailto:techserv@sial.com)

Outside USA: [eurtechserv@sial.com](mailto:eurtechserv@sial.com)

### Certificate of Analysis

Product Name:

17 $\alpha$ -Ethinylestradiol -  $\geq$ 98%

Product Number:

E4876

Batch Number:

WXBC9894V

Brand:

SIGMA

CAS Number:

57-63-6

Formula:

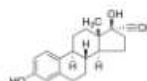
C<sub>20</sub>H<sub>24</sub>O<sub>2</sub>

Formula Weight:

296.41 AMU

Quality Release Date:

26 APR 2019



Test	Specification	Result
Appearance (Colour)	White to Off-White	White
Appearance (Form)	Powder	Powder
Solubility (Colour)	Colorless to Faint Yellow	Colorless
Solubility (Turbidity)	Clear	Clear
50 mg/ml, EtOH		
EMM	2.01 - 2.10	2.08
2.01 to 2.10 at Lambda Max of 281 TO 282 nm, in EtOH		
Wavelength	281 - 282 NM	281 NM
Purity (HPLC)	$\geq$ 98 %	100 %

Steven Chen, Manager

Quality Control

Wuxi, China CN

Nota. Producto certificado.

## Figura 36

### Cotización de muestras



UNIVERSIDAD PERUANA  
CAYETANO HEREDIA

#### Servicio de Control de Calidad

COTIZACION N° P009-2021

Lima, 02 de febrero del 2021

Señore(s):

**EISNER CASTILLO**  
Ingeniero Ambiental

Presente.-

e-mail: ewcastillo21@gmail.com

De mi consideración:

Es grato dirigirme a usted, en atención a su solicitud; a fin de remitirle los costos y requerimientos de análisis solicitados para sus productos:

#### ➤ ACETOMINOFEN Y ETINILESTRADIOL

ANALISIS	COSTO POR MUESTRA S/.	NUMERO DE MUESTRAS	TOTAL S/.	TIEMPO
• Determinación Cuantitativa de Acetaminofén (HPLC)	200.00	120	24,000 + IGV	10 días después de recibida la muestra
• Determinación Cuantitativa de Etinilestradiol (HPLC)	200.00	120	24,000 + IGV	

**Nota** : El costo indicado corresponde por cada "muestra", lote y/o presentación  
Los tiempos indicados son días hábiles

**Requerimiento** : Cantidad de muestra: 20 mL por muestra

**Forma de Pago** : **Por Adelantado**

Cta. Cte. Banco de Crédito (S/) 191-0657346-0-57 (Depósito o Transferencia Bancaria)

Cta. Cte. Banco de la Nación (S/) 00000608556 (Pago de Detracciones - 12%)

Cheque a nombre de: **UNIVERSIDAD PERUANA CAYETANO HEREDIA**

A la espera de vernos favorecidos con su elección a fin de brindarle nuestro servicio, queda de usted.

Atentamente,

Universidad Peruana Cayetano Heredia  
Servicio de Control de Calidad

MSC. LEÓN F. VILLEGAS-VILCHEZ  
DIRECTOR

En caso de **aceptación** sirvase remitir la cotización "**sellada y firmada**" (validez 30 días)

Firma y Sello

UNIVERSIDAD ACREDITADA INTERNACIONALMENTE CON MENCIÓN ESPECIAL EN INVESTIGACIÓN

Av. Honorio Delgado N° 430, Urb. Ingeniería, San Martín de Porres / P.O. Box 4314, Lima 100

Directo: (511) 382-0321 / Central: (511) 319-0000 anexos: 233223 ó 233224

e-mail: [control.calidad@oficinas-upch.pe](mailto:control.calidad@oficinas-upch.pe) / [leon.villegas@upch.pe](mailto:leon.villegas@upch.pe)

Página Web: [www.upch.pe](http://www.upch.pe)

Nota. Muestras de etinilestradiol.



**Tabla 17***Prueba de normalidad de eficiencia de remoción de etinilestradiol*

			<b>Kolmogorov-Smirnov<sup>a</sup></b>		<b>Shapiro-Wilk</b>			
			Estadístico	gl	Sig.	Estadístico	gl	Sig.
<b>Eficiencia remoción de etinilestradiol</b>			0,244	9	0,131	0,857	9	0,089

		<b>Estadístico de Levene</b>	<b>gl1</b>	<b>gl2</b>	<b>Sig.</b>
<b>Eficiencia remoción de etinilestradiol</b>	Se basa en la media	8,04	2	6	0,06
	Se basa en la mediana	0,62	2	6	0,57
	Se basa en la mediana y con gl ajustado	0,62	2	2,993	0,59
	Se basa en la media recortada	6,49	2	6	0,03

H0: La eficiencia de remoción de etinilestradiol se distribuye de forma normal

H1: La eficiencia de remoción de etinilestradiol no se distribuye de forma normal

Con un nivel de significancia de 0,06 ( $P_{valor} > 0,05$ ) no podemos rechazar la hipótesis nula, por lo tanto, la eficiencia de remoción de etinilestradiol tuvo una distribución normal y cumplimos con el primer supuesto de normalidad de la variable dependiente (eficiencia de remoción de etinilestradiol).

**Tabla 18***Prueba de homogeneidad de la eficiencia de remoción de etinilestradiol de F de Levene*

	<b>Suma de cuadrados</b>	<b>gl</b>	<b>Media cuadrática</b>	<b>F</b>	<b>Sig.</b>
<b>Entre grupos</b>	1,541	2	0,771	18,576	0,003
<b>Dentro de grupos</b>	0,249	6	0,041		
<b>Total</b>	1,790	8			

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 0,06 ( $P_{valor} > 0,05$ ) 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.

**Tabla 19**

*Análisis de varianza (ANOVA) de eficiencia de remoción de etinilestradiol*

(I) Repetición del tratamiento	Diferencia de medias (I-J)	Desv. Error	Sig.	Intervalo de confianza al 95%		
				Límite inferior	Límite superior	
<b>R1</b>	R2	0,40000	0,16631	0,115	-0,1103	0,9103
	R3	1,00667*	0,16631	0,002	0,4964	1,5170
<b>R2</b>	R1	-0,40000	0,16631	0,115	-0,9103	0,1103
	R3	,60667*	0,16631	0,025	0,0964	1,1170
<b>R3</b>	R1	-1,00667*	0,16631	0,002	-1,5170	-0,4964
	R2	-,60667*	0,16631	0,025	-1,1170	-0,0964

\* 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 0,025 ( $P_{valor} > 0,05$ ) 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.

**Tabla 20**

*Prueba de Tukey*

Repetición del tratamiento	N	Subconjunto para alfa = 0,05	
		1	2
<b>R3</b>	3	1,1467	
<b>R2</b>	3		0,7467
<b>R1</b>	3		0,1400
<b>Sig.</b>		1,000	0,115

Se visualizan las medias para los grupos en los subconjuntos homogéneos

**Tabla 21***Prueba de variación de medias*

<b>R1</b>	N	Válido	3
		Perdidos	0
	Media		0,1400
	Mínimo		0,12
	Máximo		0,17
<b>R2</b>	N	Válido	3
		Perdidos	0
	Media		0,7467
	Mínimo		0,38
	Máximo		0,95
<b>R3</b>	N	Válido	3
		Perdidos	0
	Media		1,1467
	Mínimo		1,06
	Máximo		1,32

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 mg L<sup>-1</sup> de etinilestradiol 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.*

**Tabla 22**

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

		Estadístico de Levene	gl1	gl2	Sig.
<b>Remoción de etinilestradiol</b>	Se basa en la media	0,261	2	6	0,778
	Se basa en la mediana	0,048	2	6	0,953
	Se basa en la mediana y con gl ajustado	0,048	2	5,826	0,953
	Se basa en la media recortada	0,230	2	6	0,801

	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
<b>Entre grupos</b>	0,023	2	0,011	0,039	0,962
<b>Dentro de grupos</b>	1,768	6	0,295		
<b>Total</b>	1,791	8			

(I)	Adicción de Densidad Poblacional	de	Diferencia de medias (I-J)	de	Desv. Error	Sig.	Intervalo de confianza al 95%	
							Límite inferior	Límite superior
<b>100</b>	200		-0,10667		0,44317	0,969	-1,4664	1,2531
	300		-0,10667		0,44317	0,969	-1,4664	1,2531
<b>200</b>	100		0,10667		0,44317	0,969	-1,2531	1,4664
	300		0,00000		0,44317	1,000	-1,3598	1,3598
<b>300</b>	100		0,10667		0,44317	0,969	-1,2531	1,4664
	200		0,00000		0,44317	1,000	-1,3598	1,3598

Adicción de Densidad Poblacional	N	Subconjunto para alfa = 0.05
		1
<b>100</b>	3	0,6067
<b>200</b>	3	0,7133
<b>300</b>	3	0,7133
<b>Sig.</b>		0,969

**Propuesta técnica de tratamiento con la aplicación de microlagas *Chlorella sp.*, para la remoción de etinilestradiol en aguas residuales**

## **I. Introducción**

El uso de las microalgas *Chlorella sp.*, demuestra una directa relación en la remoción de contaminantes orgánicos e inorgánicos. En la investigación, se evidenció una remoción de 82,68% en promedio de etinilestradiol; dicha remoción mediada por procesos controlados como nutrientes, aireación, iluminación, monitoreo de temperatura y tiempo de retención, en presencia de la microalga *Chlorella sp.* Si planteamos como decisión técnica replicar el tratamiento en condiciones reales, la sugerencia fundamental radica en acoplarla dentro del sistema de tratamiento de aguas residuales convencionales; en la etapa de biodegradación influida por microalgas. Partiendo de una adecuada aclimatación de las cepas, verificación de los niveles de concentración de contaminantes y nutrientes (Nitrógeno, Fosforo y Potasio) que fácilmente pueden ser encontrados en las aguas residuales. Al respecto Jun et al. (2017) señala que las microalgas *Chlorella sp.*, son tolerantes en gran medida a ambientes hostiles, pero es recomendable brindarle las condiciones necesarias, a fin de no provocar estrés y terminar en inhibición.

Una de las características de la microalga *Chlorella sp.*, es su crecimiento exponencial, lo cual coadyuva a la remoción de contaminantes estrogénicos. La preocupación radicaría, en qué hacer con la microalga posterior al proceso de tratamiento. Debido a la importante cantidad de biomasa que se produce, se ve necesaria la correcta gestión para que suponga un aspecto benéfico y no una limitación al momento de implementar tratamiento con microalgas. Una alternativa es la digestión anaerobia de la biomasa para producir biogás junto con los sistemas convencionales utilizados en la línea de depuración de lodos en una Planta de Tratamiento de Aguas Residuales; sin perder la misión de mejorar la biodegradabilidad.

Dependiendo de la especie y las condiciones de cultivo, las microalgas tienen una producción de biomasa rápida en comparación con otros cultivos energéticos y debido a su alto contenido de grasa y aceite, son una alternativa diseñada para producir biodiesel y azúcares fermentables y hacerlos viables para la minería y producción de bioetanol. Además, la extracción de lípidos produce residuos que contienen nitrógeno y fósforo, que pueden ser reutilizados como sustrato para microalgas y procesados por fermentación anaeróbica para producir metano, lo que contribuye al equilibrio económico del proceso de biorrefinería (Castillo et al., 2017).

## **II. Objetivos**

### **2.1. Objetivo general**

- Elaborar una propuesta técnica de tratamiento con aplicación de microalgas *Chlorella sp.*, para remoción de etinilestradiol en aguas residuales.

### **2.2. Objetivos específicos**

- Describir la realidad problemática de la presencia de etinilestradiol en las aguas residuales.
- Describir las principales aplicaciones de la microalga *Chlorella sp.*, como biotecnología.
- Estimar un probable presupuesto en la aplicación de microalgas *Chlorella sp.*, para la remoción de etinilestradiol en aguas residuales.

## **III. Desarrollo de la propuesta**

La presente propuesta, se enmarca en un proceso integral; el cual, al ser aplicado, debe ser evaluado previamente a fin de definir y determinar las características propias de las aguas residuales y de los contextos sociales en el cual se incluya.

Al presentarse como un proceso integral, la aplicación debe partir por la identificación estadística de la población que usa y/o consume etinilestradiol, como producto anticonceptivo y/o tratamiento de sustitución hormonal; además realizar un análisis etario y grupo de género para cuantificar la excreción natural del estrógeno. Esta etapa previa, es fundamental como parte de la planificación del trabajo y ser conscientes de las fugas y/o pérdidas hacia otras fuentes de agua, que muchas veces no son dotadoras del afluente de un sistema de tratamiento de aguas residuales. Con esta información, se tendrá la capacidad establecer y/o proponer métodos de regulación en su uso y normativas que permitan un tratamiento adecuado; esto por los niveles de afectación que suponen en condiciones de cuerpo receptor a los microorganismos que coexisten en ellos.

### **3.1. Propuesta normativa**

El etinilestradiol, como análogo sintético del estradiol; representa uno de los contaminantes emergentes necesarios de ser vigilados; debido a las evidencias teorizadas sobre los efectos que supone en las condiciones de cuerpo receptor y por ende a los organismos que en el habitan. A nivel europeo, se cuenta con regulación normativa para efluentes provenientes de vertidos hospitalarios en el cual se

incluyen macronutrientes comunes y microcontaminantes como fármacos, agentes de diagnóstico y desinfectantes. A nivel nacional, en el marco de monitoreo, evaluación, vigilancia y fiscalización, contamos con el Decreto Supremo N°003-2010-MINAM, por el cual se aprueban los Límites Máximos Permisibles para efluentes de Plantas de Tratamiento de Aguas Residuales domésticas; regulando siete parámetros (Aceites y grasas, coliformes termotolerantes, DBO, DQO, pH, sólidos totales en suspensión y temperatura), no encontrándose regulación para fármacos.

El valor permisible de este estrógeno sintético presente en aguas corresponde a  $0,001 \text{ ug L}^{-1}$  (Directiva 2000/60/CE); la teoría señala que estos “estrógenos ambientales” pueden poner en peligro la reproducción y desarrollo de la fauna acuática, incluso a concentraciones muy bajas (nanogramos por litro) (Ayala, 2017).

Como parte de la investigación se determinó una concentración de  $0,0034 \text{ mg L}^{-1}$ , representando un problema para las condiciones ambientales del recurso hídrico, microorganismos y población que se podría abastecer de agua para actividades de riego, bebida de animales o de consumo humano. Por tanto, el aspecto normativo en cuanto a la regulación de vertidos de este tipo, es el principal punto de partida para el diseño y aplicación de propuestas ambientales que coadyuven a la protección de la calidad de vida de las poblaciones; puesto que, representan un referente obligatorio que permitan garantizar el efectivo ejercicio de los derechos y el cumplimiento de las obligaciones y responsabilidades en materia ambiental. Esto supondrá determinar nuevos niveles de calidad, aplicando el principio de gradualidad, permitiendo ajustes progresivos a dichos niveles para las actividades que suponen una generación de los mismos, contar con valores permisibles y tratamientos que conduzcan a la eficiencia. Amparados en las obligaciones del Estado peruano, el cual está facultado para establecer niveles de gestión ambiental, prioridades de desarrollo y salud pública; que favorezcan y optimicen la calidad ambiental; mismos que se sustentan en normativas internacionales y sustentos técnico – científicos a fin de evitar procesos de contaminación, degradación y/o fragmentación del ambiente.

### **3.2. Propuesta de tratamiento**

Las microalgas poseen una capacidad remediadora que consiste en la eliminación o biotransformación de contaminantes de un medio líquido o gaseoso. Estos compuestos contaminantes son captados por la biomasa algal y pueden ser recuperados mediante su cosecha. Esta capacidad resulta en un sistema de cultivo con dos propósitos: eliminación de contaminantes y producción de biomasa con fines comerciales. Ambos objetivos dependen del sistema de cultivo, la o las especies cultivadas y los factores ambientales.

La utilización de medios contaminados en el cultivo impacta directamente en los costos de producción. La elección del tipo de sistema de cultivo es importante, y debe realizarse en base a factores biológicos, técnicos, ambientales y económicos, definidos previamente. La producción de biomasa de microalgas ha proporcionado una amplia gama de productos biotecnológicos con usos en la industria alimenticia, salud y medicina humana, alimentación animal, compuestos orgánicos y biocombustibles.

En los años 60, se inició el uso de microalgas para el tratamiento de aguas residuales; sin embargo, en la actualidad aún no se ha podido implementar como un sistema a escala industrial; debido a que es necesario solventar ciertas limitaciones que impiden alcanzar la eficiencia de los sistemas de tratamiento convencional; es por ello que, actualmente, no se puede plantear el uso de microalgas como un sistema de tratamiento por sí solo, sino como una etapa dentro del sistema de tratamiento en una PTAR, muchas veces como tratamiento secundario o como terciario, permitiendo cumplir con los límites de vertimiento, así como la eliminación de contaminantes emergentes; el hecho de que las microalgas puedan ser cultivadas en agua residual se basa en la similitud de la composición del agua residual con los nutrientes ineludibles para el desarrollo de las microalgas, siendo estos principalmente carbón, nitrógeno y fósforo (Gómez et al., 2021).

El uso de microalgas elimina de manera eficiente la mayoría de los productos farmacéuticos, con tasas de eliminación de 40-60%, que surgen de procesos como bioadsorción y bioacumulación a la biomasa de microalgas, representando una buena tecnología verde, de bajo costo y más sostenible (García et al., 2020).



Como propuesta, se sugiere implementar una laguna facultativa en la cual se cultive microalgas *Chlorella sp.*, se le brinde las condiciones necesarias para su crecimiento y desarrollo, garantizando procesos de remoción de contaminantes emergentes y otros que son característicos de las aguas residuales. Con la implementación de lagunas facultativas, será posible generar consorcios microbianos presentes en los mucilagos de las microalgas; facilitando los procesos de remoción, mediados a través de la estabilización de materia orgánica, siendo una característica importante para favorecer la relación simbiótica de los microorganismos.

### **3.3. Propuesta de recuperación de microalgas posterior a su uso**

La producción de biocombustibles, utilizando microalgas, como una gran promesa de suministro energético enfrenta muchos desafíos para ser económicamente competitivo.

El proceso de recuperación de microalgas tiene una serie de ventajas: la producción primaria es controlable en el laboratorio, altamente escalable, posee balance energético muy positivo, captura y recicla CO<sub>2</sub> para aumentar su tasa de crecimiento y proporcionar la capacidad de modificar su composición bioquímica a través de la modificación de la composición de su medio de cultivo, no requiere grandes áreas para el cultivo extensivo, no compiten con la seguridad alimentaria, no dependen de insumos agrícolas ni pesticidas, no contaminan el suelo ni afluentes de agua.

En general, la producción de biocombustibles se puede clasificar en 2 grandes grupos: por conversión termoquímica y por conversión bioquímica. El primer grupo consiste en la descomposición térmica de la biomasa para producir productos combustibles e involucra las técnicas de: gasificación para producción de gas de síntesis; licuefacción termoquímica para producción de bioaceite; pirólisis para bioaceite, gas de síntesis y carbón vegetal; y combustión directa para producción de electricidad. La conversión bioquímica en cambio consiste en la degradación biológica de la biomasa a través de reacciones químicas y biológicas asociadas a procesos metabólicos de microorganismos, e involucra las técnicas de digestión anaerobia para producción de biogás; fermentación alcohólica para producir etanol;

y la producción fotobiológica para producción de hidrógeno (Hernández y Labbé, 2021).

En comparación con el diesel de petróleo, el diesel de microalgas tiene una reducción de hasta un 78% en emisión de CO<sub>2</sub>. Además, es económica y tecnológicamente mejor que la producción de biodiesel a partir de muchas especies vegetales terrestres por requerir menor superficie terrestre para obtener mayor biomasa (Brennan & Owende 2020). Otra de las opciones técnicas, es producir biofertilizantes y bioestimulantes para uso agrícola, debido al alto contenido de nitrógeno en la biomasa; previo a ello, será necesario un tratamiento de hidrólisis enzimática para liberar compuestos y estabilizar la biomasa para su uso comercial. Además de proporcionar nutrientes la biomasa de microalgas es una fuente de fitohormonas y estimulantes de crecimiento, por lo que la biomasa tiene un alto valor agrícola (Escarpada, 2017).

Asimismo, es viable pensar en la instalación de cámaras de microalgas como parte del proceso de tratamiento o fotobiorreactores.

- **Cámaras de algas:** Como sistemas adaptados para las pequeñas escalas de producción. Se caracterizan por ser cultivos de algas escalares, en donde el volumen del cultivo va en constante aumento. En las cámaras de algas, el control de la temperatura se hace por medio de la combinación de termostatos y calefactores, mientras la luz, que siempre es artificial, llega por medio de tubos fluorescentes, con el fin de distribuirse de forma homogénea, emitiendo bajas cantidades de luz.
- **Fotobiorreactores:** La tarea del fotobiorreactor es maximizar las condiciones necesarias para el crecimiento óptimo de las microalgas, condiciones que reducen la contaminación y las pérdidas de CO<sub>2</sub>. Dependiendo del tipo de construcción, los fotobiorreactores pueden ser planos o tubulares, horizontales, verticales, inclinados (verticales), serpentines o múltiples. Si el modo de operación es el de referencia, pueden ser operados por aire o bombas, reactores monofásicos o reactores bifásicos.

Por último, teniendo en cuenta lo anterior, las microalgas han cobrado importancia en diversos campos de producción. Así, entonces, las microalgas han comenzado a

ser relevantes en la acuicultura, en los biocombustibles, en estudios sobre contaminación, en las mareas rojas, en la productividad acuática, entre otros.

#### **IV. Conclusiones**

- Se elaboró una propuesta técnica de tratamiento con aplicación de microalgas *Chlorella sp.*, para remoción de etinilestradiol en aguas residuales; presentándose como una alternativa técnica, económica y ambientalmente sostenible.
- Se describió la realidad problemática de la presencia de etinilestradiol en las aguas residuales, advirtiéndose como señala la teoría un problema ambiental emergente.
- Se describió las principales aplicaciones de la microalga *Chlorella sp.*, como biotecnología; en la remoción de contaminantes emergentes, producción de alimentos, medicamentos y biocombustibles.
  - Se estimó un probable presupuesto en la aplicación de microalgas *Chlorella sp.*, para la remoción de etinilestradiol en aguas residuales; presentándose como una alternativa viable.

#### **V. Recomendaciones**

- Generar información respecto a los niveles de emisión de contaminantes estrogénicos en aguas residuales, identificar sus rutas de ingreso y sus principales consecuencias en las condicionantes ambientales, como un estudio específico, el cual requiere de asegurar presupuesto para su implementación.
- Implementar el uso de microalgas *Chlorella sp.*, dentro del sistema de tratamiento convencional de las aguas residuales; a fin de coadyuvar con los procesos de tratamiento secundarios.
- Regular normativas a nivel nacional que permitan tener un control y vigilancia de fármacos u otro tipo de contaminantes emergentes en cuerpos hídricos; partiendo por la regulación del principio precautorio y responsabilidad ambiental.

#### **VI. Referencias bibliográficas**

- Ayala, M. (2017). *Estrógenos, contaminantes emergentes en cuerpos de agua*. Milenio. <https://www.milenio.com/cultura/estrogenos-contaminante-emergente-en-cuerpos-de-agua>.

- Brennan, L., y Owende, P. (2020). *Biofuels from microalgae-A review of technologies for production, processing, and extractions of biofuels and co-products*. *Renewable and Sustainable Energy Reviews* 14(1), 557-577.
- Castillo. O., Torres, S., Núñez, C., Peña, V., Herrera, C., y Rodríguez, J. (2017). *Producción de biodiesel a partir de microalgas: avances y perspectivas biotecnológicas*. *Scielo*. 27(3), 337-352. <https://www.scielo.org.mx/pdf/hbio/v27n3/0188-8897-hbio-27-03-337.pdf>.
- Escarpada, C. (2017). *Biorremediación de aguas contaminadas con nutrientes y fármacos mediante microalgas*. (Tesis doctoral, Universidad de León). <https://buleria.unileon.es/handle/10612/6773>.
- García, M., Arashiro, L., Santos, L., Insa, S., Rodríguez, S., Barceló, D., Ferrer, I., y Garfí, M. (2020). *Destino de los fármacos prioritarios y sus principales metabolitos y productos de transformación en sistemas de tratamiento de aguas residuales a base de microalgas*. *ELSEVIER. Diario de materiales peligrosos*. 390(1), 127-771. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2019.121771>.
- Gómez, C., Morales, M., Acién, F., Escudero, R., Fernández, J., & Molina, E. (2021). *Utilization of secondary treated wastewater for the production of freshwater microalgae*. *Appl. Microbiol. Biotech.* 99, 6391-6944.
- Hernández, A., y Labbé, J. (2021). *Microalgas, cultivo y beneficios*. *Revista de biología marina y oceanografía*, 49(2), 157-173. 10.4067/S0718-19572014000200001
- Jun, C., Quing, Y., Ke, L., Jianzhong, L. y Junhu, Z (2017). *Eliminación de etinilestradiol de las aguas residuales mediante la mutación de microalgas Chlorella PY-ZUI con fijación de CO<sub>2</sub>*. *ELSEVIER. Tecnología bioambiental*, 249(1), 284-289. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2017.10.036>.