

## TESIS DOCTORAL

*Eliminación de disruptores  
endocrinos en aguas residuales  
mediante procesos basados en  
microalgas empleando un enfoque  
de biorrefinería*

Autora:

Noelia García Vázquez

Directores

Juan José Espada Sanjurjo  
Luis Fernando Bautista Santa Cruz

Programa de Doctorado en Tecnologías Industriales: Química,  
Ambiental, Energética, Electrónica, Mecánica y de los Materiales

Escuela Internacional de Doctorado

2025

©2024 Autora Noelia García Vázquez  
Algunos derechos reservados  
Este documento se distribuye bajo la licencia  
“Atribución 4.0 Internacional” de Creative Commons,  
disponible en <https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/deed.es>

*“La victoria pertenece a los más perseverantes”*

Napoleón Bonaparte

# Agradecimientos

Agradecer a mis directores Juan José Espada y Fernando Bautista por toda la ayuda, la comprensión y la confianza que habéis depositado en mí y, sobre todo, por saber centrarme cuando tenía crisis existenciales experimentales. A Gemma Vicente y a Rosalía Rodríguez, gracias por las largas charlas en vuestro despacho y por aconsejarme y ayudarme todo lo posible.

A Pilar, no sabría como agradecerle todo lo que has hecho por mí, gracias por todo, por nuestras largas conversaciones para tratar de regularnos en el banco (muchas fallidas), por regañarnos la una a la otra por irnos tarde y por todas esas cosas que solo nosotras entendemos. Eres sin duda una de las mejores cosas que me ha dado esta tesis, mi pena o mi pánico. Gracias a Jenni, fuiste la primera en ayudarme aquí y eso jamás podré olvidarlo (y esas algas que matamos tampoco). Gracias por cada palmerita que nos comimos cuando algo salía bien y por estar también en los peores momentos. Alex y Carlos, aunque no os he podido perdonar que os fueseis a Japón sin mí no me olvido de vosotros, también habéis sido una parte fundamental de esta etapa.

Jesús, ¿qué haría yo aquí sin ti? Gracias por todas esas tardes en Experimentación III hasta las mil, por ser como eres y por ese sentido del humor tuyo. Elena, gracias por ser como un rayito de luz en un día malo, siempre sabes que decir para animarnos y tienes un abrazo preparado en la recámara para esos días regulares. A Lady Miriam, siempre recordaré que empezamos a hablar porque éramos las únicas que estábamos los viernes por la tarde (y eso une mucho), solo puedo añadir que eres la mejor. A María (futbolista), gracias por estar ahí desde los días más difíciles en el CAT hasta en los momentos más surrealistas, como cuando te salvamos un ojo del ácido clorhídrico. A José Manuel, gracias por todos esos ratitos hablando de videojuegos y cosas frikis varias que nos ayudan a evadirnos de todo el estrés y por preocuparte todos los días de que hubiese comido. A Stevie, gracias por ser mi compi hasta las 21 aquí muchos días y por cuidarnos siempre.

A la antesala 130, Alberto L., Alberto G., Carlos y Nagore, gracias por conseguir sacarme una sonrisa siempre, sois increíbles. Especial mención a Albertillo, que me deja comida en la mesa cuando sabe que tengo un mal día.

A mis queridísimas Marta e Isa, porque al fin podremos hacer ese viaje que llevábamos planeando desde que empecé esta andadura; gracias por nuestras charlas, por estar siempre a mi lado y por formar parte de esta etapa.

Gracias a Spirigrupito, a Carlos, Ana, Alex, Ram, Sandra, Moncho y Andrea, habéis sido una pieza fundamental en este proceso y, aunque no lo sepáis, me habéis hecho un poquito más fácil el camino en muchos momentos.

A mi familia, en especial a mis padres, porque sin vuestro apoyo, esfuerzo y comprensión no hubiese podido llegar donde estoy ahora. Gracias por creer siempre en mí y estar presentes en cada paso de este viaje dándome fuerzas para continuar. A mi hermano, Alberto, es imposible no pasárselo bien contigo y reírse cuando nos vemos.

A Marcos, gracias por tu infinita paciencia en los peores momentos, por saber escucharme, entenderme y apoyarme cuando creía que no podía más. Por haberme sabido acompañar en este camino tan duro, sobre todo al final. Por no dejarme nunca que abandonase. Always.

## **Publicación surgida de la presente investigación**

- García, N., Rodríguez, R., Vicente, G., Espada, J. J., & Bautista, L. F. (2024). Comprehensive Study on Endocrine Disruptor Removal from Wastewater Using Different Microalgae Species. *Applied Sciences*, 15(1), 132.



# Resumen

El agua es un recurso fundamental para la vida, ampliamente utilizado tanto en el ámbito doméstico como en numerosos sectores industriales. Sin embargo, nos encontramos en un contexto global de escasez hídrica, agravado por la creciente demanda y la presión derivada del cambio climático. Esta situación hace imprescindible adoptar una gestión sostenible del recurso, en la que la reutilización de aguas residuales juega un papel clave.

Este nuevo enfoque requiere del desarrollo de tecnologías avanzadas de depuración, capaces de revalorizar este recurso más allá del tratamiento convencional. Las estaciones depuradoras de aguas residuales (EDAR) tradicionales presentan limitaciones importantes, especialmente en la eliminación de un alto contenido en nutrientes como el nitrógeno y el fósforo, así como de contaminantes emergentes, entre los que destacan los compuestos disruptores endocrinos (CDEs). Estos últimos, han cobrado especial relevancia por su capacidad para alterar el sistema endocrino de organismos acuáticos y humanos, incluso en concentraciones muy bajas.

En los últimos años, la preocupación por los CDEs ha aumentado considerablemente, debido tanto a su elevada producción como a su abundante presencia en diferentes masas de agua, tanto superficiales, como subterráneas y residuales. Dado que los tratamientos actuales no están diseñados específicamente para su eliminación, resulta necesario desarrollar procesos innovadores que eviten su vertido y reintroducción en el ciclo del agua. Entre las tecnologías emergentes para la eliminación de CDEs se encuentran procesos de oxidación avanzada, cloración o tratamientos basados en membranas. No obstante, estas alternativas presentan una serie de desventajas importantes, como su selectividad solo hacia determinados compuestos, su alta demanda energética y sus elevados costes. En este contexto, los sistemas basados en microalgas representan una alternativa prometedora y sostenible. Estos microorganismos, tanto eucariotas como cianobacterias, han despertado un gran interés en los últimos años por sus múltiples aplicaciones, desde la obtención de productos de alto valor añadido (como carotenoides o ficobiliproteínas), hasta su uso en la obtención de biocombustibles (como el biogás) y en procesos de biorremediación. Gracias a su capacidad para asimilar simultáneamente carbono orgánico e inorgánico, nitrógeno y fósforo presentes en las aguas residuales, mientras producen biomasa, las microalgas ofrecen una alternativa integral a los tratamientos convencionales. Además, durante su crecimiento, fijan el CO<sub>2</sub> atmosférico a través de la fotosíntesis, contribuyendo a la mitigación del cambio climático. A esto se suma su capacidad para eliminar CDEs, reforzando su potencial en el tratamiento avanzado de aguas residuales.

El objetivo principal de esta tesis es evaluar un sistema basado en microalgas para la depuración de aguas residuales domésticas, logrando la eliminación de nutrientes y la degradación de CDEs. Además, se persigue el aprovechamiento energético de la biomasa

obtenida tras el tratamiento mediante digestión anaerobia para la producción de biogás, integrando ambos procesos dentro del concepto de biorrefinería en el marco de la economía circular para el tratamiento de aguas residuales.

Para lograr este objetivo, el primer paso fue desarrollar un método preciso, fiable y robusto para la detección de la mezcla de estudio de CDEs en muestras acuosas. Se seleccionó una estrategia combinada basada en extracción en fase sólida (SPE) y cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) acoplada a un detector de matriz de diodos (DAD). Para ello, se empleó un enfoque inverso, en primer lugar, se desarrollaron dos métodos cromatográficos mediante HPLC-DAD y, una vez se logró la identificación y cuantificación de los CDEs, se evaluó el efecto de distintas variables sobre la recuperación de los contaminantes en el proceso de SPE (masa de adsorbente, volumen de muestra, volumen de eluyente y pH). Con los resultados obtenidos y considerando las limitaciones experimentales existentes, se desarrolló un protocolo de SPE que permitió enriquecer eficazmente las muestras en los analitos de interés. Posteriormente, se estudiaron dos estrategias de biorrefinerías basadas en el uso de microalgas como tratamiento biológico (secundario) o como tratamiento terciario para la depuración de aguas residuales. En la primera, se evaluó su aplicación como tratamiento biológico (secundario) en una planta depuradora. Para ello, se cultivaron *Chlorella vulgaris* y *Scenedesmus* sp. en agua residual sintética (ARS), preparada en el laboratorio de forma que simulase el efluente del tratamiento primario, durante siete días. A lo largo del cultivo, se midió la eliminación de nutrientes y CDEs, el crecimiento de la biomasa, así como su composición bioquímica y elemental al final del experimento. Por otro lado, se analizaron los mecanismos de eliminación (bioadsorción, bioacumulación, bioeliminación o degradación abiótica) de los CDEs estudiados mediante balances de masa a lo largo del experimento.

Posteriormente, la biomasa obtenida se co-digirió con fangos de depuradora para su valorización mediante digestión anaerobia para obtener biogás, en condiciones mesófilas. Se realizó un pretratamiento hidrotermal a la biomasa, previo a su digestión para mejorar su biodegradabilidad y se evaluó la influencia del mismo en la producción de biogás respecto a la biomasa sin pretratar.

En la segunda estrategia de biorrefinería, se exploró la aplicación de las microalgas estudiadas como tratamiento terciario para la depuración de aguas residuales. Se evaluó el crecimiento y la capacidad de eliminación de nutrientes de *Scenedesmus* sp. y *C. vulgaris* en agua residual real (ARR) procedente de la salida del tratamiento secundario de una planta depuradora. Los resultados permitieron identificar a *Scenedesmus* sp. como la especie más adecuada para crecer en este medio. Así, esta especie fue cultivada en el agua residual real durante siete días y se monitoreó su crecimiento y la eliminación de nutrientes en presencia y ausencia de CDEs, evaluando su capacidad para degradarlos.

La presente tesis se ha dividido en cuatro bloques, cuyos resultados y conclusiones principales se muestran a continuación.

## **1. Desarrollo de un método analítico para la detección de compuestos disruptores endocrinos en aguas residuales.**

En primer lugar, se seleccionaron seis compuestos pertenecientes a diferentes familias de CDEs para conformar la mezcla con la que se doparon las muestras: metilparabeno (MeP), propilparabeno (PrP), butilparabeno (BuP), benzofenona (BP), bisfenol A (BPA) y estrona (E). Estos compuestos fueron elegidos debido a su presencia habitual en aguas residuales.

Para desarrollar el método de análisis de estos compuestos, se seleccionó un tándem de extracción en fase sólida (SPE) seguido de una cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) acoplado a un DAD, además fue necesario desarrollar primero el método de cromatografía para, tras poder cuantificar los CDEs, evaluar y seleccionar los parámetros de la SPE.

Para la cuantificación de los CDEs mediante HPLC-DAD, se establecieron como longitudes de onda: 254 nm para los parabenos y la BP y 210 nm para el BPA y la E. Para lograr una correcta separación de los compuestos, se desarrollaron dos métodos cromatográficos, uno con elución isocrática para la separación de PrP, BuP, BP, BPA y E y otro en gradiente exclusivo para MeP. En ambos casos, se empleó una mezcla de acetonitrilo y agua como fase móvil. Ambos métodos fueron evaluados y validados en función de los siguientes parámetros analíticos: factor de asimetría, resolución de picos, número teórico de platos, factor de retención, estudio de la linealidad y la precisión y estimación de los límites de cuantificación (LOQ) y detección (LOD). Los resultados mostraron que ambos métodos proporcionaban una excelente resolución cromatográfica, una buena interacción de los analitos con la columna, una alta linealidad ( $R^2 > 0,99$ ), una precisión aceptable (errores  $< 10\%$  al estimar las concentraciones) y unos valores de LOQ y LOD adecuados para trabajar en niveles de concentración en el intervalo 100-25 ppb.

Una vez establecido un método robusto para la cuantificación de la mezcla de compuestos, se desarrolló un protocolo de SPE para la preparación de muestras, con el objetivo de preconcentrar los analitos y reducir interferencias de la matriz. Se estudió el efecto del volumen de muestra, el volumen de eluyente, el pH y la masa de adsorbente tipo C18 en la recuperación de cada uno de los compuestos. En general, el cartucho con 500 mg de adsorbente ofreció las mejores recuperaciones para todos los compuestos. Se observó que un pH de 4,5 solo mejoraba las recuperaciones con volúmenes de elución bajos (0,5 mL), mientras que un pH neutro de 7 resultó más efectivo con volúmenes mayores (10 mL), al trabajar con cartuchos de 500 mg. Asimismo, la recuperación varió con el volumen de elución en función del tamaño del cartucho: en cartuchos de 50 mg, fue más eficiente volúmenes bajos (0,5 mL) y, en los de 500 mg, con volúmenes altos (10 mL). Finalmente, la dependencia de la recuperación con el volumen de muestra en cartuchos de 500 mg se vio muy influenciada por el compuesto: MeP, PrP y BPA mostraron mejores resultados con volúmenes de muestra bajos (10 mL) y BP y E lo hicieron con volúmenes altos (100 mL).

No obstante, para la selección final de los valores óptimos no solo se tuvieron en consideración estos resultados experimentales, sino que también se ajustó a las limitaciones operativas de los experimentos (disponibilidad de volumen de muestra, diferencias en el comportamiento de cada compuesto y necesidad de una concentración óptima para el análisis). Como resultado, se establecieron las siguientes condiciones finales: 30 mL de volumen de muestra, 2 mL de eluyente, pH de 7 y un cartucho con 500 mg de masa de adsorbente.

Para comprobar la fiabilidad del método desarrollado se evaluaron los siguientes factores: el punto de ruptura del cartucho, la linealidad y la reproducibilidad. En el rango de trabajo (1 ppm a 25 ppb), no se alcanzó el punto de ruptura del adsorbente, por lo que no se perdió eficacia en el proceso de recuperación. Además, se obtuvo una excelente linealidad ( $R^2 > 0,99$  para todos los compuestos, excepto MeP con  $R = 0,98$ ) y reproducibilidad. Asimismo, los ensayos con muestras reales y en presencia de microalgas confirmaron que las pérdidas de recuperación eran aceptables para este tipo de técnicas y no se detectaron interferencias ni solapamiento de picos en los cromatogramas. Finalmente, los calibrados elaborados en agua residual real presentaron  $R^2 > 0,99$  (excepto MeP con  $R^2 = 0,97$ ), lo que demuestra que el método SPE-HPLC-DAD desarrollado es adecuado para la detección de CDEs en las concentraciones de trabajo en aguas residuales y aplicable a muestras complejas.

## **2. Evaluación de un sistema basado en microalgas como tratamiento biológico**

Como punto de partida, se seleccionaron dos especies de microalgas para llevar a cabo este estudio. Las especies elegidas fueron *Scenedesmus* sp. y *C. vulgaris*, debido a su amplio uso en la eliminación de contaminantes en aguas residuales y a su capacidad para ser aisladas de plantas depuradoras.

Ambas especies fueron cultivadas durante siete días en un ARS acorde al efluente de un tratamiento primario, tanto en ausencia (control) como en presencia de 1 ppm de la mezcla de CDEs. En general, el crecimiento de *Scenedesmus* sp. fue menor que el de *C. vulgaris*, debido a que la fuente principal de nitrógeno en el ARS es el amonio, que es preferido por *C. vulgaris* en comparación con *Scenedesmus* sp.. Además, a día 7 se encontró que la presencia de CDEs había mejorado el crecimiento de *C. vulgaris* respecto al control, indicando que la eliminación de estos compuestos puede favorecer su crecimiento. El menor crecimiento de *Scenedesmus* sp. también se reflejó en el consumo de nutrientes, alcanzando una eliminación total de fosfatos en 7 días, pero solo un 32% de eliminación de amonio en presencia de CDEs y un 48% en el control. En contraste, *C. vulgaris* mostró una eliminación completa tanto de fosfatos como de amonio en el mismo periodo.

Para evaluar la eliminación de CDEs, además de los experimentos con microalgas, se estudió la influencia de la luz y el oxígeno en la degradación abiótica de estos compuestos. Para ello, se realizaron experimentos en ARS sin microalgas durante 7 días bajo diferentes

condiciones: aireación, exposición a la luz y la combinación de ambos factores. Los resultados indicaron que los parabenos no sufrieron degradación abiótica significativa, pero en presencia tanto de *C. vulgaris* como de *Scenedesmus* sp. se lograron eliminaciones totales de dichos compuestos en 7 días. Respecto a la BP, se observó una degradación abiótica superior al 90% en presencia de oxígeno (por aireación), mientras que con los experimentos realizados con microalgas se obtuvieron eliminaciones del 86% con *Scenedesmus* sp. y del 62% con *C. vulgaris*. El BPA presentó una degradación abiótica de aproximadamente el 20%, pero en presencia de microalgas la eliminación aumentó hasta el 82% con *Scenedesmus* sp. y el 90% con *C. vulgaris*. Finalmente, la E mostró una degradación abiótica únicamente en presencia de BP, lo que sugiere un efecto sinérgico entre ambos compuestos. En ausencia de BP, la degradación abiótica de E fue apenas del 5% en 7 días, mientras que en presencia de BP alcanzó el 40%. La eliminación a los siete días alcanzó el 70% y el 83% con *Scenedesmus* sp. y *C. vulgaris*, respectivamente.

Finalmente, se evaluó la contribución de los diferentes mecanismos de eliminación para cada CDEs mediante los balances de masa. La biodegradación fue el mecanismo predominante para los parabenos en ambas especies, representando entre el 99,3% y el 100% de la eliminación total diaria para MeP, entre el 95,6% y el 100% para PrP y entre el 99,8% y el 100% para BuP. Además, se detectó una leve bioadsorción de MeP (hasta el 1,71%) y PrP (hasta el 1,44%) en *Scenedesmus* sp. En el caso de la BP la degradación abiótica fue el principal mecanismo, con contribuciones del 91,3% al 98,5% de la eliminación total diaria, aunque se observó una pequeña fracción adsorbida en ambas especies (0,91-1,49% con *Scenedesmus* sp. y 1,43-4,38% con *C. vulgaris*). Por otro lado, la bioeliminación fue el mecanismo principal para el BPA para las dos especies, representando entre el 63,2% y el 100% de la eliminación diaria total, con una fracción bioadsorbida relevante en *C. vulgaris* (hasta un 11,2%). Finalmente, para la E se identificaron dos mecanismos clave: la degradación abiótica y la biodegradación. En *Scenedesmus* sp. la bioeliminación se volvió significativa desde el segundo día (68%), mientras que en *C. vulgaris* este proceso no fue evidente hasta el séptimo día (40,3%).

### **3. Valorización de la biomasa: digestión anaerobia**

Como ya se ha comentado anteriormente, la biomasa cultivada después de la eliminación de nutrientes y CDEs, se sometió a un proceso de digestión anaerobia para producir biogás, siguiendo el esquema de biorrefinería. La composición de pared celular de las microalgas dificulta su biodegradabilidad y la disponibilidad de carbohidratos, lípidos y proteínas para las bacterias involucradas en la digestión anaerobia. Por este motivo, se llevó a cabo un pretratamiento hidrotérmico sobre la biomasa algal cultivada, sometiéndola a 140°C y 3 bares de presión durante 20 minutos. Este pretratamiento de hidrólisis térmica aumentó la demanda química de oxígeno (DQO), el amonio y el fosfato soluble del sobrenadante, lo que indicó que se había producido la ruptura de la pared celular y la liberación de compuestos intracelulares.

En cuanto a la producción de metano acumulado obtenido durante los 32 días de experimento en condiciones mesófilas, se registraron los siguientes valores: 280,01 mL CH<sub>4</sub>/g SV con *Scenedesmus* sp. para la biomasa sin pretratar y 367,72 mL CH<sub>4</sub>/g SV para la biomasa pretratada. Para *C. vulgaris*, estos valores fueron de 348,82 mL CH<sub>4</sub>/g SV sin pretratar y 521,35 mL CH<sub>4</sub>/g SV tras el pretratamiento. En general, se obtuvo una mayor producción de metano con *C. vulgaris* en comparación con *Scenedesmus* sp., que se atribuye a la mayor cantidad de lípidos que contiene la primera, que tienen mayor contenido energético que las proteínas y los carbohidratos. Se concluyó que el pretratamiento de hidrólisis térmica mejoró la obtención de metano en comparación con la biomasa sin tratar. En particular, la producción fue 1,3 veces mayor para *Scenedesmus* sp. y 1,5 veces mayor para *C. vulgaris*.

#### **4. Evaluación de un sistema basado en microalgas como tratamiento terciario**

En primer lugar, se evaluó la idoneidad de las especies de microalgas estudiadas en el apartado anterior para la eliminación de CDEs presentes en un ARR procedente de la salida del tratamiento secundario de una planta depuradora. Para ello, se cultivaron *Scenedesmus* sp. y *C. vulgaris* por separado en ARR y se analizó su crecimiento y capacidad de eliminación de nutrientes. Los resultados confirmaron que la especie que mejor se adaptó a este medio fue *Scenedesmus* sp., debido principalmente a que la fuente predominante de nitrógeno en el ARR eran los nitratos, forma preferida por esta especie.

Para evaluar la eficiencia en la eliminación de CDEs en el ARR, *Scenedesmus* sp. fue cultivada durante 7 días en ARR en ausencia (control) y en presencia de 1 ppm de la mezcla de CDEs. En este caso, los experimentos se llevaron a cabo en fotobiorreactores de 5 L. En cuanto al crecimiento, se observó que fue adecuado tanto en el control como en las muestras en presencia de CDEs, alcanzando una densidad algal final de 0,18 g/L y 0,28 g/L, respectivamente. La eliminación de nutrientes fue eficiente, logrando una degradación completa de fosfatos en 7 días y una eliminación de nitratos del 70% para el control, mientras que en las muestras dopadas se alcanzó un 90%.

En el estudio de la eliminación de CDEs, se comparó la degradación de estos compuestos en presencia de microalgas con la degradación abiótica (en presencia de luz y aireación). Los resultados mostraron que los parabenos se degradaron completamente de forma abiótica en 7 días, mientras que en presencia de *Scenedesmus* sp. no se alcanzó una eliminación total. Los resultados obtenidos para esta familia de CDEs sugieren que el PrP y el BuP podrían estar degradándose en MeP, tanto en condiciones abióticas como en presencia de microalgas. La BP no se degradó completamente en ninguno de los casos, aunque la presencia de *Scenedesmus* sp. mejoró su degradación hasta el 56%. Finalmente, el BPA y la E no mostraron degradación abiótica, pero en presencia de microalgas se logró su eliminación completa en 7 días.

En conjunto, todos estos resultados demuestran la idoneidad de los tratamientos basados en microalgas para la eliminación eficaz de CDEs en aguas residuales,

posicionándolos como una alternativa sostenible y prometedora para mejorar la calidad del efluente tratado y contribuir a una gestión más circular, eficiente y respetuosa del recurso hídrico.



# Índice de abreviaturas

**ACN:** Acetonitrilo  
**ACV:** Análisis de ciclo de vida  
**ADN:** Ácido desoxirribonucleico  
**AEOM:** materia orgánica extracelular algal  
**AGV:** Ácidos grasos volátiles  
**ANVISA:** Agencia Nacional de Vigilancia Sanitaria  
**AP:** Alquilfenoles  
**APEO:** Alquilfenoles etoxilados  
**ARN:** Ácido ribonucleico  
**ARR:** Agua residual real  
**ARS:** Agua residual sintética  
**ART:** Agua residual tratada  
**ATP:** Adenosín trifosfato  
**BeP:** Bencilparabeno  
**BFR:** Bifenilos polibromados  
**BMP:** Potencial bioquímico de metano  
**BP:** Benzofenona  
**BP-1:** Benzofenona-1 o 2-4-dihidroxibenzofenona  
**BP-2:** Benzofenona-2 o 2,2',4,4'-Tetrahidroxibenzofenona  
**BP-3:** Benzofenona-3 o 2-hidroxi-4-metoxibenzofenona  
**BP-4:** Benzofenona-4 o ácido 2-hidroxi-4-metoxibenzofenona-5-sulfónico  
**BP-6:** Benzofenona-6 o 2,2'-dihidroxi-4,4'-dimetoxibenzofenona  
**BP-12:** Benzofenona-12 o 2-hidroxi-4-(octiloxi)-benzofenona  
**BPA:** Bisfenol A  
**BPAP:** Bisfenol AP  
**BuP:** Butilparabeno  
**CDE:** Compuesto disruptor endocrino  
**CG:** Cromatografía de gases  
**CPFA:** Compuestos per- y polifluoroalquilados  
**DA:** Digestión anaerobia  
**DAD:** Detector de matriz de diodos  
**DDE:** Diclorodifenildicloroetileno  
**DDT:** Diclorodifeniltricloroetano  
**DBO:** Demanda biológica de oxígeno  
**DQO:** Demanda química de oxígeno  
**E:** Estrona  
**EAOP:** Procesos electroquímicos basados en oxidación avanzada  
**EE. UU.:** Estados Unidos  
**EDAR:** Estación depuradoras de aguas residuales  
**EDSP:** Programa de Evaluación de Disruptores Endocrinos  
**ELISA:** Ensayos de inmunoabsorción ligado a enzimas  
**ENP:** Etoxilatos de nonilfenol  
**EOP:** Etoxilatos de octilfenol  
**EPA:** Agencia de Protección Ambiental  
**EPS:** Sustancias poliméricas extracelulares

**ESI:** Ionización por electrospray  
**EtP:** Etilparabeno  
**FC:** Factor de concentración  
**FDA:** Administración de Alimentos y Medicamentos  
**FLD:** Detector de fluorescencia  
**HBCD:** Hexabromociclododecano  
**HPLC:** Cromatografía líquida de alta resolución  
**HRAP:** Estanques de algas de alta tasa  
**HT:** Hidrólisis térmica  
**iBuP:** Isobutilparabeno  
**IE:** Ionización electrónica  
**ILOQ:** Límite de cuantificación instrumental  
**iPrP:** Isopropilparabeno  
**LLME:** Microextracción líquido-líquido  
**LOD:** Límite de detección  
**LOQ:** Límite de cuantificación  
**MAE:** Extracción por microondas  
**MBR:** Biorreactores de membrana  
**meOH:** Metanol  
**MeP:** Metilparabeno  
**MS:** Detector de espectrometría de masas  
**NADP+:** Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato oxidada  
**NADPH:** Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato reducida  
**NAT:** Nitrógeno amoniacal total  
**NP:** Nonilfenol  
**NT:** Nitrógeno total  
**OMS:** Organización Mundial de la Salud  
**OP:** Octilfenol  
**OTC:** Compuestos organoestánicos  
**PBDE:** Éteres de polibromodifenilos  
**PCDD:** Dibenzo-p-dioxinas policloradas  
**PCB:** Bifenilos policlorados  
**PCDF:** Dibenzofuranos policlorados  
**PCP:** Productos de cuidado personal  
**PHBA:** Ácido p-hidroxibenzoico  
**PrP:** Propilparabeno  
**PSII:** Fotosistema II  
**PT:** Fósforo total  
**PTFE:** Politetrafluoroetileno  
**POC:** Pesticidas organoclorados  
**POF:** Pesticidas organofosfatos  
**PVC:** Policloruro de vinilo  
**ROS:** Especies reactivas de oxígeno  
**SPE:** Extracción en fase sólida  
**ST:** Sólidos totales  
**SV:** Sólidos volátiles  
**TBBP-A:** Tetrabromobisfenol A  
**TCD:** Detector de conductividad térmica

**TDH:** Trastorno de déficit de atención con hiperactividad  
**TMP:** Rendimiento máximo teórico de metano  
**TRFIA:** Inmunoensayo de fluorescencia resuelta en el tiempo  
**TRH:** Tiempo de retención hidráulico  
**UAE:** Unidades de actividad enzimática  
**UE:** Unión Europea  
**UHPLC:** Cromatografía líquida de ultra alta presión  
**UV:** Ultravioleta



# Índice

|        |                                                                                         |     |
|--------|-----------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| 1.     | Introducción .....                                                                      | 1   |
| 1.1.   | La gestión sostenible del agua: necesidad y desafíos actuales .....                     | 1   |
| 1.2.   | Compuestos disruptores endocrinos .....                                                 | 4   |
| 1.2.1. | CDEs sintéticos .....                                                                   | 6   |
| 1.2.2. | Métodos de detección de CDEs en las aguas .....                                         | 25  |
| 1.2.3. | Legislación.....                                                                        | 29  |
| 1.2.4. | Tratamientos para la eliminación de CDEs en aguas residuales .....                      | 31  |
| 1.3.   | Métodos basados en microalgas para la eliminación de CDEs de las aguas residuales ..... | 38  |
| 1.3.1. | Microalgas y cianobacterias .....                                                       | 38  |
| 1.3.2. | Cultivo de microalgas .....                                                             | 39  |
| 1.3.3. | Mecanismos de eliminación de CDEs .....                                                 | 51  |
| 1.4.   | Biorrefinería.....                                                                      | 55  |
| 1.4.1. | Producción de biogás a partir de microalgas .....                                       | 56  |
| 1.4.2. | Biorrefinerías propuestas .....                                                         | 64  |
| 2.     | Objetivos.....                                                                          | 69  |
| 3.     | Metodología.....                                                                        | 73  |
| 3.1.   | Cultivo de microalgas .....                                                             | 73  |
| 3.2.   | Método analítico para la detección de CDEs en aguas residuales .....                    | 74  |
| 3.3.   | Experimentos del sistema basado en microalgas como tratamiento biológico .....          | 79  |
| 3.4.   | Experimentos de digestión anaerobia (DA) para la revalorización de la biomasa .....     | 90  |
| 3.5.   | Experimentos del sistema basado en microalgas como tratamiento terciario. ....          | 98  |
| 4.     | Resultados y discusión.....                                                             | 105 |
| 4.1.   | Desarrollo de un método analítico para la detección de CDEs en aguas residuales .....   | 105 |
| 4.1.1. | Método de cromatografía líquida: HPLC-DAD .....                                         | 105 |

|        |                                                                                |     |
|--------|--------------------------------------------------------------------------------|-----|
| 4.1.2. | Método de extracción en fase sólida .....                                      | 116 |
| 4.1.3. | Ensayos con muestras reales .....                                              | 137 |
| 4.2.   | Evaluación de un sistema basado en microalgas como tratamiento biológico ..... | 142 |
| 4.2.1. | Crecimiento de las microalgas en ARS .....                                     | 142 |
| 4.2.2. | Eliminación de nutrientes y CDEs .....                                         | 146 |
| 4.2.3. | Estudio de los mecanismos de eliminación de CDEs .....                         | 171 |
| 4.3.   | Valorización de la biomasa algal: digestión anaerobia .....                    | 179 |
| 4.3.1. | Caracterización de la biomasa de partida .....                                 | 179 |
| 4.3.2. | Pretratamiento: hidrólisis térmica.....                                        | 180 |
| 4.3.3. | Producción de biogás .....                                                     | 182 |
| 4.4.   | Evaluación de un sistema basado en microalgas como tratamiento terciario ..... | 190 |
| 4.4.1. | Caracterización del agua residual.....                                         | 190 |
| 4.4.2. | Selección de la especie de microalga .....                                     | 191 |
| 4.4.3. | Crecimiento de <i>Scenedesmus</i> sp. en ARR.....                              | 193 |
| 4.4.4. | Eliminación de nutrientes y CDEs .....                                         | 195 |
| 5.     | Conclusiones .....                                                             | 209 |
| 5.1.   | Recomendaciones futuras.....                                                   | 213 |
| 6.     | Bibliografía .....                                                             | 217 |
| 7.     | Anexos .....                                                                   | 265 |
| 7.1.   | Calibrados CDEs.....                                                           | 265 |
| 7.2.   | Calibrados nutrientes.....                                                     | 266 |

# 01

## INTRODUCCIÓN



# 1. Introducción

## 1.1. La gestión sostenible del agua: necesidad y desafíos actuales

El agua constituye un recurso esencial para la vida y una materia prima fundamental en diversas industrias, como la farmacéutica, electrónica, alimentaria, de bebidas, petroquímica, agroquímica, y de gas y petróleo, además de su uso en el ámbito doméstico [1]. Sin embargo, a pesar de su importancia, únicamente el 2,5% del agua presente en el planeta es dulce, y de esta fracción, menos del 1% se encuentra accesible para el ser humano [2].

En las últimas décadas, el desarrollo industrial y el aumento de la población mundial han provocado un incremento drástico en la demanda de agua dulce. Se estima que, para el año 2050, el consumo global de agua con fines agrícolas, industriales y municipales aumentará entre un 20% y un 30% [3]. Este escenario se ve agravado por la persistente desigualdad en el acceso a este recurso, ya que más de 770 millones de personas en todo el mundo no tienen acceso a agua potable y segura para consumo y uso doméstico. Además, alrededor de 700 millones habitan ya en regiones que enfrentan una escasez crónica de agua [4].

A este panorama se añade el impacto del cambio climático, que está teniendo un efecto crítico sobre la gestión de los recursos hídricos, alterando los patrones de precipitación, favoreciendo los fenómenos meteorológicos extremos, la subida del nivel del mar o la acidificación de los océanos [5]. Actualmente, se estima que más del 50% de la población mundial vive en áreas sometidas a una importante escasez de agua forzada por el cambio climático [4], y las proyecciones indican que para 2030 el mundo podría enfrentarse a un déficit del 40% en la disponibilidad de agua, lo cual representa un gran desafío para el desarrollo social y económico [6].

En este contexto de creciente demanda, presión climática y recursos limitados, resulta imprescindible avanzar hacia una gestión integral y sostenible del agua, que garantice el acceso a agua limpia a la generación actual sin comprometer las necesidades de las generaciones futuras. En este marco, el tratamiento de aguas residuales cobra un papel fundamental, ya que no solo contribuye a aumentar la disponibilidad de este recurso, sino que también permite reducir la presión sobre los recursos hídricos naturales [4,7].

El término "aguas residuales como recurso" representa un cambio profundo de paradigma, ya que lo que anteriormente se consideraba un residuo problemático y una fuente de enfermedades, hoy se reconoce como un recurso estratégico con potencial para afrontar los desafíos relacionados con el abastecimiento y el

saneamiento del agua, siendo especialmente interesante en zonas áridas y semiáridas. No obstante, para que este enfoque se traduzca en beneficios reales, es imprescindible el desarrollo y la implementación de tecnologías adecuadas que permitan valorizar el agua residual [4].

Las estaciones depuradoras de aguas residuales (EDAR) convencionales se centran en la eliminación de sólidos en suspensión mediante procesos mecánicos y en la reducción de la demanda biológica de oxígeno (DBO) a través de tratamientos biológicos [8]. Su principal objetivo es disminuir la carga de materia carbonosa y compuestos de nitrógeno (N) y fósforo (P) en las aguas residuales antes de su vertido en sistemas receptores, como ríos y lagos, para prevenir la eutrofización. El vertido de elevadas concentraciones de nitrógeno y fósforo en los efluentes provoca la denominada eutrofización, un fenómeno caracterizado por el crecimiento descontrolado de fitoplancton y algas que reduce la transparencia del agua y, en consecuencia, limita la penetración de luz hacia la vegetación acuática sumergida. Esto disminuye la producción de oxígeno ( $O_2$ ) disuelto generado por la fotosíntesis. Posteriormente, cuando esta biomasa se descompone, el  $O_2$  disuelto sigue disminuyendo debido a la actividad de bacterias heterótrofas que degradan la materia orgánica biodegradable. Como resultado, se generan condiciones hipóxicas o anóxicas, las cuales pueden afectar a la flora y fauna autóctonas [9]. En la Figura 1 - 1 se presentan las etapas típicas de las que consta habitualmente una EDAR convencional [10,11].

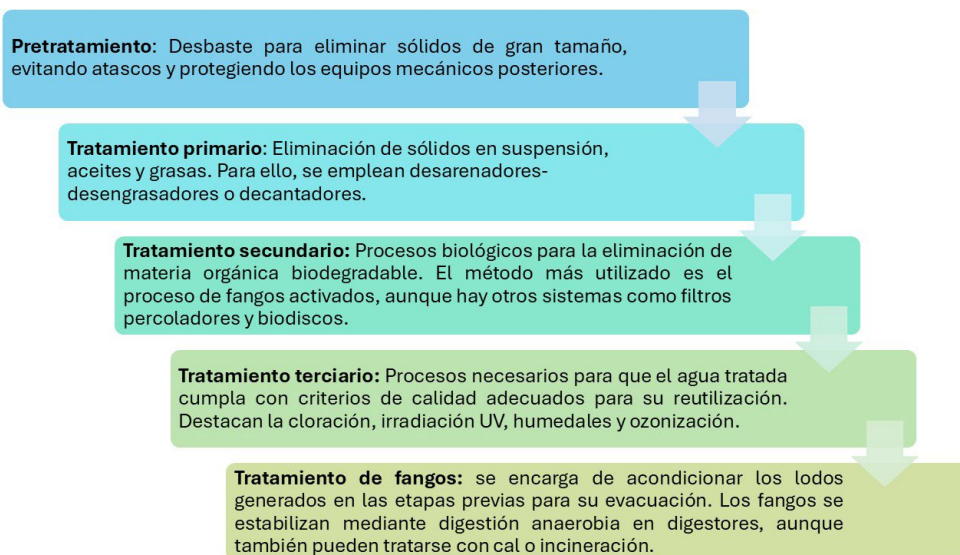


Figura 1 - 1. Etapas del tratamiento de aguas residuales en una EDAR.

Estas EDAR están diseñadas para cumplir con los requisitos de vertido pertinentes, habitualmente relacionados con la DBO, la demanda química de oxígeno (DQO), el total de sólidos en suspensión, el fósforo total (PT) y el nitrógeno total (NT).

Sin embargo, a pesar de su eficacia en la eliminación de N, P y carbono (C) orgánico, tienen una capacidad de degradación limitada con otra gran variedad de sustancias químicas que están apareciendo en las aguas residuales [3]. Por ejemplo, no logran eliminar muchos contaminantes emergentes presentes en aguas residuales municipales, como productos farmacéuticos y metales pesados. Además, su eficacia es reducida en el tratamiento de aguas agrícolas, que contienen altas concentraciones de nutrientes, pesticidas, herbicidas, antibióticos y otros fármacos administrados a animales. Del mismo modo, las aguas industriales, aunque presentan menor contenido de N y P, suelen contener elevadas concentraciones de C, sólidos y compuestos tóxicos, como fenoles y metales pesados, lo que dificulta su adecuado tratamiento con tecnologías convencionales [3,8].

Todo ello evidencia la falta de tecnologías eficaces para la recuperación del agua utilizada, lo que está agravando la contaminación de los recursos hídricos [6] y favoreciendo que los contaminantes presentes en las aguas residuales municipales, agrícolas e industriales - como microplásticos, compuestos disruptores endocrinos (CDEs), metales pesados y altas concentraciones de nitratos, fosfatos y carbono - puedan ingresar a la cadena alimentaria, afectando los ecosistemas y la salud humana [8].

Particularmente, los CDEs se plantean en los últimos años como una preocupación significativa para la salud pública [12], debido a que potencialmente pueden causar efectos adversos en la salud humana y los ecosistemas acuáticos, especialmente alterando el equilibrio hormonal, cuando superan una determinada concentración [13]. La abundante presencia de CDEs en el medio ambiente se debe principalmente a las actividades humanas. El ecosistema acuático es el más afectado por esta contaminación, fundamentalmente debido a las descargas de contaminantes en ríos, lagos y mares. Aunque algunas de estas descargas pueden considerarse accidentales, como los vertidos o las deposiciones atmosféricas, lamentablemente la mayoría son intencionadas y provienen de los efluentes de ciertas industrias y de las EDAR, consideradas como “puntos calientes” de CDEs [14,15]. Como resultado, se han detectado CDEs tanto en aguas superficiales como subterráneas [16–18], en ambientes marinos [19–21], aguas residuales [22,23], y en ríos y lagos [24–27]. La concentración de estos compuestos en las aguas suele estar entre 1 ng/L y 1 µg/L, aunque en algunos casos pueden ser superiores [28].

Todo lo anteriormente expuesto pone de manifiesto la urgente necesidad de desarrollar nuevas estrategias para el tratamiento de aguas residuales. Estas deben superar las limitaciones de las tecnologías convencionales mediante procesos más eficientes, estables y sostenibles, capaces de operar con menor consumo energético, reducir la emisión de carbono, minimizar la producción de lodos y optimizar la recuperación de recursos reciclables. Además, estas innovaciones deben alinearse con los principios de desarrollo sostenible, priorizando una menor

huella de carbono, un menor consumo de energía y un mayor reciclaje de recursos, apostando por una gestión más circular del agua [6].

Solo mediante el avance tecnológico en el campo del tratamiento de aguas residuales será posible promover la reutilización del agua y, con ello, afrontar los desafíos actuales relacionados con este recurso y avanzar hacia una gestión verdaderamente sostenible. Para ello, es imprescindible abordar la creciente presencia de CDEs en los ecosistemas acuáticos, cuyos efectos nocivos sobre la salud y el medio ambiente requieren de una gran atención.

## 1.2. Compuestos disruptores endocrinos

Según el National Institute of Environmental Health Sciences estadounidense, los compuestos disruptores endocrinos (CDEs) se definen como *“sustancias químicas naturales o artificiales que pueden imitar o interferir con las hormonas del cuerpo, conocidas como sistema endocrino. Estos químicos están relacionados con muchos problemas de salud tanto en la vida salvaje como en las personas”* [29]. Esto implica que estos agentes son capaces de interferir con la síntesis, secreción, transporte, unión o eliminación de hormonas naturales en el cuerpo, las cuales son responsables de mantener la homeostasis, la reproducción, el desarrollo y/o el comportamiento [30].

La disrupción endocrina puede manifestarse a través de diversos mecanismos, entre los que destacan los siguientes:

- **Imitación de hormonas naturales.** Algunos CDEs pueden actuar como hormonas endógenas naturales, desencadenando respuestas no deseadas, tales como la evasión de mecanismos de defensa y la alteración de procesos de desarrollo [31].
- **Bloqueo de efectos hormonales.** Pueden interferir o bloquear las hormonas naturales o sus receptores, alterando, por ejemplo, su metabolismo en el hígado [32].
- **Alteración de los niveles hormonales.** Los CDEs pueden modificar la producción, descomposición o almacenamiento de hormonas en el organismo, afectando los niveles hormonales generales [31].
- **Disrupción hormonal múltiple.** Diversos CDEs pueden interferir con varias hormonas, afectando potencialmente a múltiples sistemas del organismo. Por ejemplo, la exposición a BPA puede alterar la producción de hormonas tiroideas y de estradiol en los ovarios, lo que puede repercutir en el comportamiento, el metabolismo, la función tiroidea y la reproducción [33].
- **Interfiriendo en la síntesis hormonal.** Algunos CDEs pueden afectar a la producción de hormonas en las glándulas endocrinas. Por ejemplo, los ftalatos pueden reducir la síntesis de testosterona en los testículos fetales de ratas, resultando en una insuficiencia de testosterona [34,35].

- **Alteración del transporte hormonal.** Pueden modificar la biodisponibilidad hormonal al interferir en la distribución de las hormonas en los tejidos sensibles o en su circulación, incluso desplazándolas de sus proteínas de unión en el suero. Esto puede resultar en una alteración de la liberación activa de hormonas en los tejidos diana [36].
- **Afección del metabolismo hormonal.** Pueden interferir en los procesos metabólicos del organismo, afectando la síntesis y el control de las concentraciones hormonales naturales [37].

Estas alteraciones pueden afectar a múltiples órganos y glándulas endocrinas, tales como el hipotálamo, la glándula suprarrenal, el timo, el páncreas o las gónadas [38], como se muestra en la Figura 1 - 2.

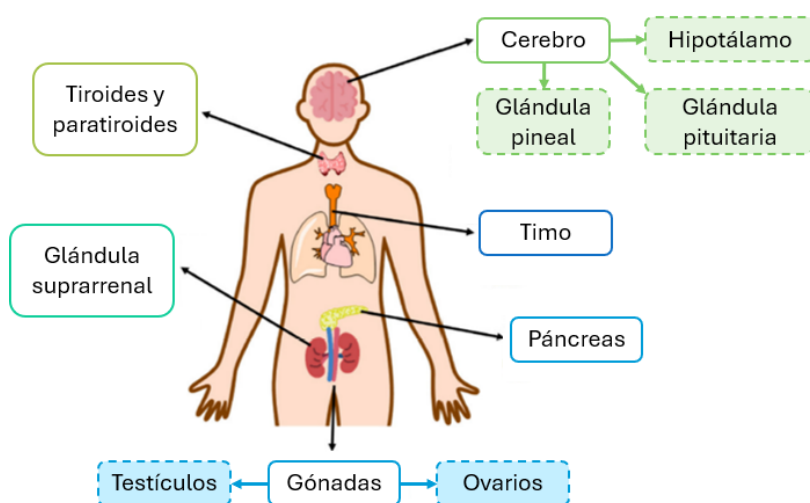


Figura 1 - 2. Resumen de las principales glándulas objetivo de los CDEs. Adaptación de Pironti et al. (2021) [38].

Cabe destacar que los efectos toxicológicos de los CDEs sobre la salud, a su vez, dependen de varios parámetros, como el modo de exposición, el tipo de compuesto, la concentración en la que esté presente o la presencia de otros CDEs en el entorno, ya que se pueden producir sinergias negativas entre ellos. Además, otros factores como la etnia, el género o la pertenencia a grupos de la población más vulnerables, como mujeres embarazadas o niños, también pueden influir [39].

Estos compuestos presentan una elevada heterogeneidad, lo que hace que los criterios para su clasificación sean muy diversos. Atendiendo a su origen pueden clasificarse como sigue:

- Los **CDEs naturales** incluyen metales pesados, como el cadmio o el arsénico, compuestos químicos, como el yodo, y sustancias derivadas de hongos, plantas y bacterias, como los fitoestrógenos o las cianotoxinas [39].

- Los **CDEs sintéticos** son aquellos generados por el hombre y utilizados principalmente en la industria y la agricultura. Estos, a su vez, pueden agruparse en [40]:
  - Pesticidas.
  - Productos químicos sintéticos de uso doméstico o industrial.
  - Plásticos y plastificantes.
  - Fungicidas.
  - Agentes farmacéuticos.

En las últimas décadas, la preocupación por los efectos toxicológicos de los CDEs, particularmente aquellos de origen sintético, ha aumentado significativamente. Esta atención se debe principalmente a dos factores: primero, la alta producción de estos compuestos, como los ftalatos, cuya fabricación anual en Europa alcanza 1 millón de toneladas [41]; y segundo, el aumento de la contaminación por estos compuestos [42]. Diversas investigaciones han demostrado que la principal vía de exposición humana a estos contaminantes es la alimentación, ya sea a través de los propios alimentos o de sus envases. Por ejemplo, se ha detectado la presencia de bisfenol A (BPA) en productos cárnicos enlatados, conservas de pescado o botellas de agua [43].

Aunque los CDEs sintéticos son actualmente los que generan mayor inquietud, es importante destacar que los CDEs naturales también pueden interactuar con los receptores endocrinos y alterar el equilibrio hormonal, aunque su potencia sea inferior a la de las hormonas endógenas. La exposición más significativa a CDEs naturales en los seres humanos ocurre a través de la ingesta de alimentos, especialmente en dietas ricas en soja, té verde y mostaza dulce [44].

### 1.2.1. CDEs sintéticos

#### 1.2.1.1. Pesticidas

Los pesticidas son compuestos químicos empleados para eliminar organismos no deseados en cultivos, áreas públicas, casas y jardines, como roedores, hongos, insectos, y parásitos en medicina [45]. Existen principalmente tres tipos de pesticidas: organoclorados (POC), organofosfatos (POF) y carbamatos [46]. En términos generales, la exposición a pesticidas puede estar asociada con efectos adversos significativos, incluyendo enfermedades como el cáncer, alergias, y trastornos neurológicos o reproductivos [45].

#### A) Pesticidas organoclorados (POC)

Las moléculas de POC están compuestas por átomos de carbono, hidrógeno y cloro, dispuestos en diversas configuraciones estructurales. Estos compuestos presentan propiedades de lipofilicidad, bioacumulación y biomagnificación, lo que les confiere una elevada persistencia y toxicidad. La exposición a POC en humanos puede ocurrir por inhalación, contacto dérmico o ingesta de alimentos, siendo esta

última la vía principal. A medida que los POC se biomagnifican en la cadena trófica, los consumidores de alimentos de origen animal, como pescado, carne o leche, experimentan niveles elevados de exposición. Un ejemplo de esta bioacumulación y persistencia la presenta el diclorodifeniltricloroetano (DDT), que puede permanecer durante 50 años en el tejido adiposo [47].

El DDT, cuyas propiedades insecticidas fueron descubiertas en 1939, es conocido por sus significativas consecuencias ambientales y su asociación con la drástica disminución de numerosas poblaciones animales. Aunque su uso fue restringido a principios de la década de 1970, la exposición a este plaguicida sigue siendo generalizada. En los países desarrollados, su lenta eliminación del organismo implica que una gran proporción de la población aún presenta niveles detectables de DDT o su metabolito, el diclorodifenildicloroetileno (DDE), en el cuerpo. Además, en los países en desarrollo, su uso continúa, lo que resulta en ingestas diarias superiores a los niveles recomendados en muchos bebés amamantados [48]. La estructura química del DDT y del DDE se presentan en la Figura 1 - 3.

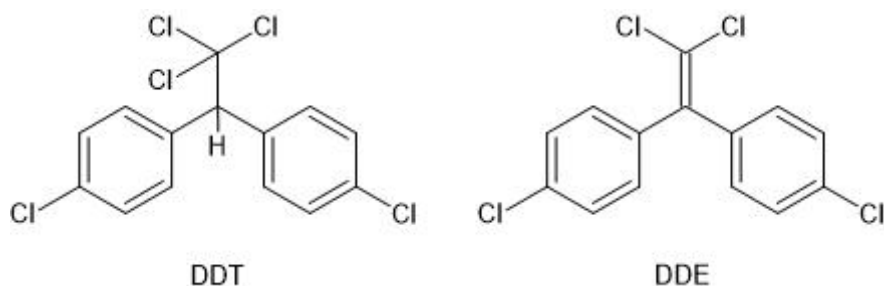


Figura 1 - 3. Estructura química del diclorodifeniltricloroetano (DDT) y del diclorodifenildicloroetileno (DDE). Elaboración propia.

La exposición al DDT puede producir obesidad en niños y adultos [49,50], cáncer de páncreas y efectos negativos sobre la reproducción y el desarrollo, incluyendo muertes fetales [48]. Por su parte, el DDE puede causar diabetes tipo 2 [51], mientras que otros POC, como el hexaclorociclohexano, provocan crecimiento lento en lactantes [52]. Además, el Lindano altera funciones respiratorias y deteriora las funciones endocrinas, nerviosas, renales, hepáticas y reproductivas [53].

### B) Pesticidas organofosforados (POF)

Los POF son compuestos orgánicos derivados de ésteres de fósforo, generalmente derivados tiólicos o amidas de los ácidos tiofosfórico, fosfínico, fosfónico y fosfórico, con cadenas laterales adicionales de grupo fenoxi, cianuro y tiocianato. Además de su aplicación como herbicidas, pesticidas e insecticidas, también se utilizan como componentes en el gas nervioso [54].

La estructura básica de estos POF incluye un oxígeno terminal unido al fósforo mediante un doble enlace, formando un grupo fosforilo, dos grupos lipofílicos unidos al fósforo y un grupo saliente, generalmente haluro, también unido al fósforo [55]. Entre los POF utilizados como insecticidas se incluyen el acefato, el propetamfos, el diazinón o el terbufós, siendo el uso de estos dos últimos regulado por la Agencia de Protección Ambiental de Estados Unidos (EPA) [56], cuya estructura molecular aparece en la Figura 1 - 4.

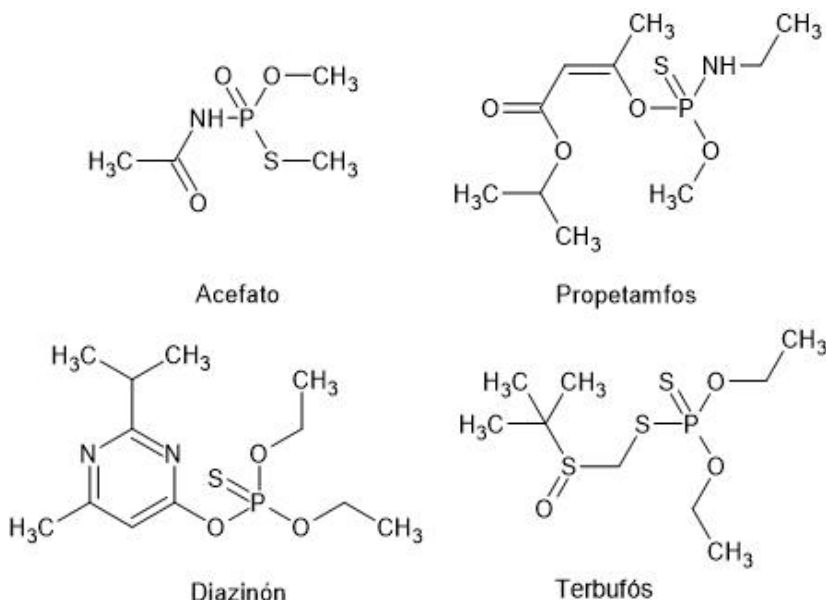


Figura 1 - 4. Estructura química del acefato, propetamfos, diazinón y terbufós. Elaboración propia.

Otros POF muy empleados son el glifosato, el clorpirifos o el malatión. La exposición al primero puede causar asma y rinitis, trastorno del espectro autista, Parkinson o hipotiroidismo, entre otros [57]. Además, el clorpirifos puede disminuir los niveles plasmáticos de testosterona, aumentar la hormona foliculoestimulante y luteinizante [58], y afecta a la homeostasis de las glándulas tiroides y suprarrenales [59]. Por su parte, el malatión genera daño hepatocelular en el tejido hepático y aumenta la actividad de las enzimas hepáticas [60].

### C) Carbamatos

Los carbamatos, derivados del ácido aminofórmico, son compuestos N-metilcarbamatos que generalmente presentan alta polaridad y solubilidad en agua, así como baja estabilidad térmica. Sin embargo, no es posible generalizar las propiedades de este grupo [61].

A diferencia de otros plaguicidas como los POF, los carbamatos no son persistentes en el medio ambiente. Pese a ello, su degradación es crucial debido a su toxicidad para los seres vivos. Tal es así, que la Organización Mundial de la Salud (OMS) clasifica los plaguicidas carbamatos como tóxicos, peligrosos y de uso restringido [62]. Algunos de los plaguicidas carbamatos más utilizados son el carbaril, el carbofurano y el aminocarb, cuya configuración molecular se recoge en la Figura 1 - 5 [63].

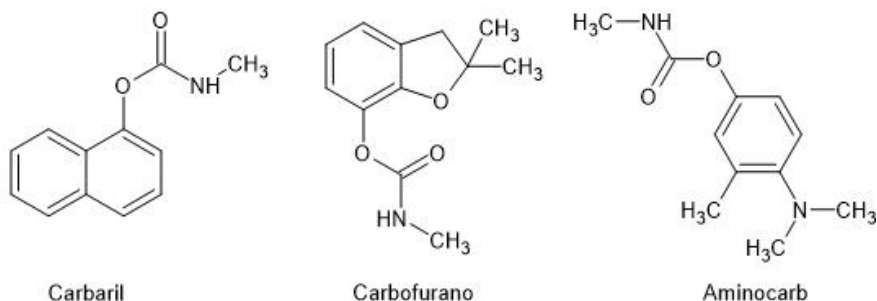


Figura 1 - 5. Estructura química del carbaril, el carbofurano y el aminocarb. Elaboración propia.

Entre los efectos secundarios de los carbamatos como el carbaril o la carbendazima destacan los daños en el ácido desoxirribonucleico (ADN) y mutaciones cromosómicas en espermatozoides [64], la embriotoxicidad, la disminución en el recuento de espermatozoides, la inhibición de su movilidad y el aumento la incidencia de anomalías o la disfunción de las células hepáticas [65].

#### 1.2.1.2. Productos químicos sintéticos de uso doméstico o industrial

En esta categoría se incluyen CDEs presentes en productos destinados a usos tanto industriales como domésticos, tales como detergentes alquilfenoletoxilatos, retardantes de llama, disolventes, lubricantes y sus subproductos. Se trata así de compuestos de uso común y que se aplican cotidianamente en una amplia gama de productos, que incluyen desde artículos infantiles, electrónicos y productos de cuidado personal (PCP), hasta textiles y materiales de construcción [32]. A continuación, se detallan algunos de los CDEs más representativos de esta categoría.

##### A) Dioxinas

Las dioxinas constituyen un grupo de compuestos organoclorados caracterizados por la presencia de dos anillos bencénicos enlazados por dos átomos de oxígeno, y que contiene entre cuatro y ocho átomos de cloro. Este grupo incluye las dibenzo-*p*-dioxinas policloradas (PCDDs), los dibenzofuranos (PCDFs), los bifenilos (PCBs) y sus derivados [66]. A diferencia de los PCBs, los PCDDs y los PCDFs nunca se han producido intencionadamente con fines comerciales. De hecho, las dioxinas son subproductos no deseados de procesos industriales y de combustión [67]. Actualmente, la liberación más significativa de estas sustancias al medio ambiente proviene principalmente de la incineración, el blanqueo con cloro de papel y la pulpa

de papel, y la fabricación de ciertos pesticidas, herbicidas y fungicidas [66]. Entre las pequeñas fuentes naturales de dioxinas se incluyen las erupciones volcánicas y los incendios forestales [42]. La estructura química de las PDCCs, los PCDFs y los PCBs aparece en la Figura 1 - 6.

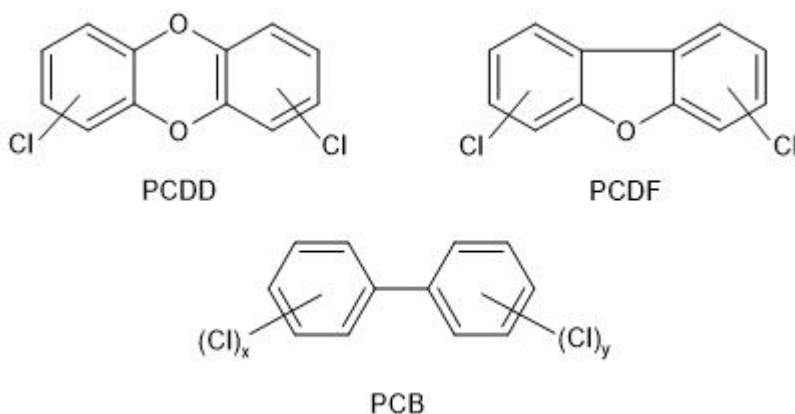


Figura 1 - 6. Estructura química general de las dibenzo-*p*-dioxinas (PCDDs), los dibenzofuranos (PCDFs) y los bifenilos policlorados (PCBs). Elaboración propia.

La exposición humana a las dioxinas ocurre fundamentalmente a través de consumo de alimentos contaminados con PCDDs y PCDFs. Esto se debe a la acumulación de estas sustancias en la cadena alimentaria, especialmente en alimentos ricos en grasas como los lácteos, los huevos y algunos pescados. Entre los efectos adversos asociados a esta exposición se encuentran las lesiones en tejidos blandos, linfomas, lesiones cutáneas y cáncer de estómago [68]. A estos efectos se le suma, por ejemplo, la diabetes mellitus tipo 2 debida a la exposición a 2,3,7,8-tetraclorodibenzo-*p*-dioxina [69].

#### ❖ **Bifenilos policlorados:**

Los PCBs constituyen una familia de 209 compuestos con estructuras moleculares similares, caracterizadas por poseer dos anillos bencénicos unidos, así como entre 1 y 10 átomos de cloro. Estos compuestos poseen propiedades químicas y físicas, como baja inflamabilidad y aislamiento eléctrico, que les hacen idóneos para aplicaciones industriales, incluyendo fluidos aislantes eléctricos y de transferencia de calor. Entre sus aplicaciones comerciales más destacadas se encuentra su uso como fluidos dieléctricos en condensadores y transformadores, así como aditivos en pinturas, adhesivos, sellantes y plásticos [70,71].

Después de varios incidentes de intoxicación humana por PCBs, como el ocurrido en el oeste de Japón en 1968 y otro en Taiwán entre 1978 y 1979, aumentó la preocupación por la seguridad de estos compuestos, lo que llevó a su prohibición. Su descontaminación comenzó en Estados Unidos en 1978. Sin embargo, en algunos países de Europa y Asia, su uso continuó hasta 1980, e incluso más tarde.

Actualmente, no se conoce ningún país en el mundo que continúe fabricándolos, excepto para la síntesis de pequeñas cantidades con fines científicos [70,71].

La exposición a PCBs se ha relacionado con varios trastornos en humanos, principalmente toxicidad en el desarrollo, inmunotoxicidad, enfermedades metabólicas como la diabetes tipo II, trastornos tiroideos y problemas de salud reproductiva tanto en mujeres como en hombres [72].

### B) Compuestos per- y polifluoroalquilados (CPFAs)

Estas sustancias conforman un amplio grupo de origen antropogénico. Sus moléculas se caracterizan por una cadena de carbono alifática, la cual puede ser lineal, ramificada o cíclica, y contienen al menos un grupo fluorado, que puede ser un grupo de metilo perfluorado ( $-\text{CF}_3$ ) o de metileno perfluorado ( $-\text{CF}_2-$ ) [73]. Estas sustancias suelen emplearse en productos de uso diario como tensioactivos, recubrimientos antiadherentes, tejidos impermeables o espumas antincendios [74]. A esta familia pertenecen compuestos como el perfluoro octanoato de amonio, el metil perfluoro propil etil o el politetrafluoroetileno (PTFE), cuyas estructuras moleculares se representan en la Figura 1 - 7 [75].

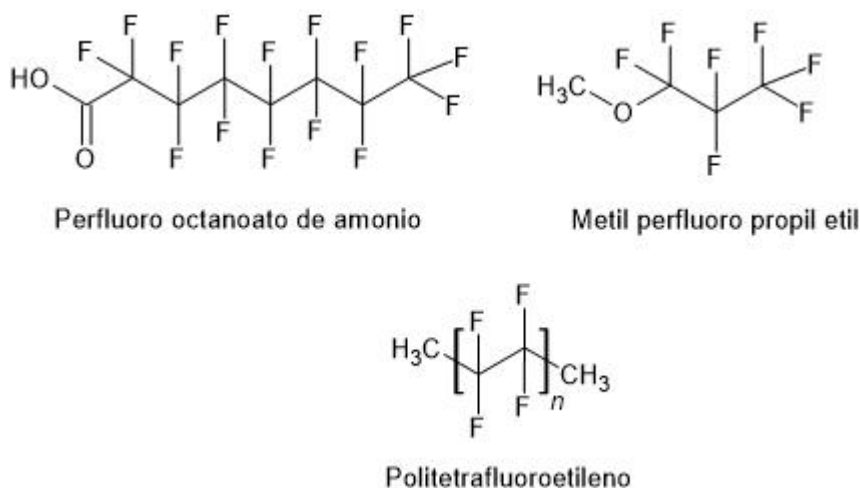


Figura 1 - 7. Estructura química del perfluoro octanoato de amonio, el metil perfluoro propil etil o el politetrafluoroetileno (PTFE). Elaboración propia.

Las principales vías de exposición a los CPFAs son a través de los alimentos y el agua potable, aunque también pueden ser adsorbidos por el organismo a través de la piel o la inhalación de aire contaminado, ya que se han detectado en el polvo [76]. Los efectos tóxicos de estas sustancias incluyen daños en el hígado, la tiroides, el sistema inmunitario, la calidad del esperma y presentan potencialmente neurotoxicidad [77]. Particularmente, la exposición al sulfonato de perfluorooctano causa hepatotoxicidad, incluyendo hepatosteatosi y hepatomegalia, y disminuye la producción de hormona tiroidea. Por otro lado, el ácido perfluorooctanoico puede

provocar toxicidad hepática, alterar los órganos reproductores masculinos y femeninos, afectar los niveles de hormonas sexuales y la expresión de genes relacionados, así como reducir el número de espermatozoides [78].

### C) Retardantes de llama bromados

Los principales compuestos de esta familia son los bifenilos polibromados (BFRs). Los BFRs están formados por sustancias químicas estructuralmente muy diferentes, con una gran variedad de características fisicoquímicas y de reactividad. Dentro de la familia de los BFRs destacan los éteres de polibromodifenilos (PBDEs), tetrabromobisfenol A (TBBP-A) y hexabromociclododecano (HBCD), que se representan en la Figura 1 - 8 [79].

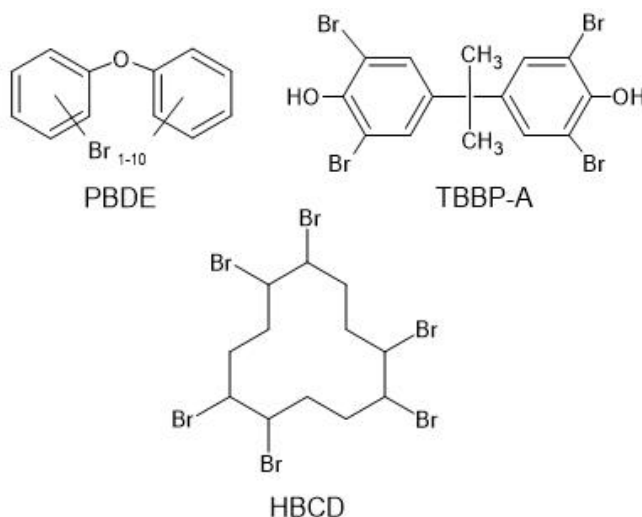


Figura 1 - 8. Estructura química de los éteres de polibromodifenilos (PBDEs), el tetrabromobisfenol A (TBBP-A) y el hexabromociclododecano (HBCD). Elaboración propia.

Estos BFRs tienen numerosas aplicaciones, por ejemplo, los PBDEs se utilizan principalmente en equipos electrónicos (televisores, ordenadores o tarjetas de circuitos), pero también en materiales de construcción, en el sector del transporte y en aparatos eléctricos [80].

La exposición a BFRs puede darse a través del aire, el polvo, o ingerido en la comida, y está asociada a enfermedades hepáticas, alteraciones en la homeostasis de la hormona tiroidea, y disfunciones en los sistemas reproductor y nervioso, con efectos negativos sobre el neurodesarrollo [81]. Específicamente, el contacto con TBBP-A puede provocar un aumento del peso absoluto y relativo del hígado, alterar la expresión de genes relacionados con los receptores de estrógenos, la biosíntesis y el metabolismo en el hígado y el útero, así como causar hiperplasia endometrial atípica [82]. Entre los BFR comerciales se encuentra el FireMaster BP-6, que en estudios con

ratas demostró su capacidad para aumentar el peso del hígado, disminuir el peso uterino grávido y afectar negativamente al peso de las crías [83].

#### D) Alquilfenoles etoxilados (APEOs)

Estos compuestos son una de las familias de tensioactivos más utilizadas, empleándose en detergentes domésticos, pesticidas y productos industriales. Entre los APEOs más comunes en el mercado se encuentran los etoxilatos de octilfenol (EOP) y los etoxilatos de nonilfenol (ENP), que aparecen en la Figura 1 - 9 [84].

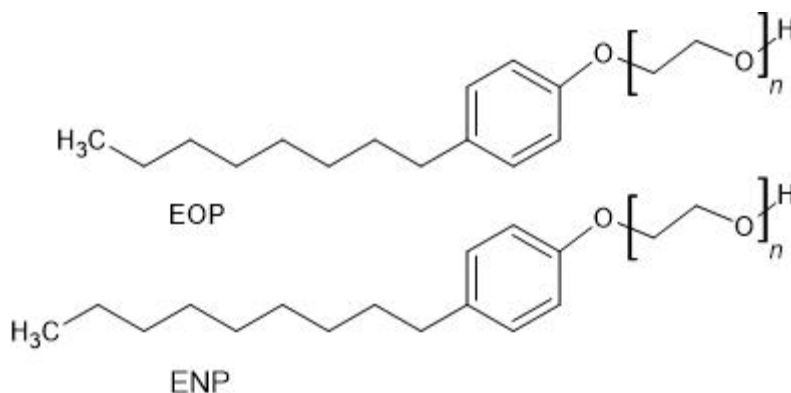


Figura 1 - 9. Estructura química de los etoxilatos de octilfenol (EOP) y de los etoxilatos de nonilfenol (ENP). Elaboración propia.

Los APEOs son reconocidos como contaminantes persistentes debido a su lenta y, en muchos casos, incompleta degradación. Al ser liberados al medio ambiente, se transforman en compuestos de cadena más corta y alquilfenoles (AP), como el nonilfenol (NP) y el octilfenol (OP), los cuales a menudo exhiben una mayor toxicidad y persistencia que los compuestos originales [84,85]. Sus estructuras químicas se presentan en la Figura 1 - 10. Las principales fuentes de liberación de AP al medio ambiente son los efluentes de las estaciones depuradoras de aguas residuales (EDAR) y los vertidos de residuos industriales [86]. Como resultado, la principal vía de exposición de los seres humanos y la fauna a estas sustancias químicas es a través del agua, aunque también se observa cierta exposición terrestre [84].

Investigaciones científicas previas sugieren que los AP pueden estar asociados a trastornos endocrinos en humanos, problemas de fertilidad y enfermedades del cerebro y del sistema nervioso [87]. Más específicamente, el NP puede imitar a la hormona natural 17 $\beta$ -estradiol, compitiendo con ella por el sitio de unión al receptor de estrógenos, posee actividad antiandrogénica y afecta negativamente a la fertilidad [88]. Además, el 4-terc-octilfenol afecta a los niveles de hormonas tiroideas (triiodotironina y tiroxina libres) [89].

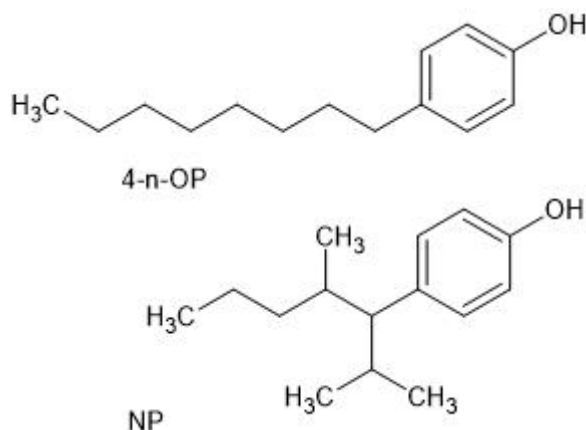


Figura 1 - 10. Estructura química del 4-n-octilfenol (4-n-OP) y del nonilfenol (NP). Elaboración propia.

### E) Parabenos

Los parabenos son ésteres alquílicos del ácido *p*-hidroxibenzoico (PHBA) que se emplean como conservantes en alimentos, cosméticos y productos farmacéuticos debido a sus propiedades antimicrobianas y antifúngicas. A esta familia pertenecen el metilparabeno (MeP), el etilparabeno (EtP), el *n*-propilparabeno (PrP), el isopropilparabeno (iPrP), el *n*-butilparabeno (BuP), el isobutilparabeno (iBuP) y el bencilparabeno (BeP) [90]. Como ejemplo, en la Figura 1 - 11 se representan las moléculas de MeP, EtP, PrP y BuP.

La principal vía de exposición humana a los parabenos es a través de los PCPs. Estos compuestos, una vez que son absorbidos por vía dérmica o gastrointestinal, se distribuyen sistemáticamente por todo el organismo. De hecho, estudios han detectado la presencia de parabenos en tejidos humanos, sangre, leche materna y orina, siendo el MeP, el EtP, el PrP y el BuP los más comunes en los fluidos biológicos [91].

En cuanto a los efectos adversos de los parabenos en la salud humana, la exposición a estos compuestos puede aumentar la proliferación de ciertas células cancerígenas [92], como las células del cáncer de mama [93] o alterar la concentración de hormonas tiroideas, como la tiroxina y la triyodotironina [94]. Es conocido que el MeP puede causar un aumento de la concentración de globulina fijadora de hormonas sexuales, mientras que el BuP disminuye la concentración de estradiol y aumenta la concentración de tiroxina libre [95], además de disminuir la calidad del esperma [96].

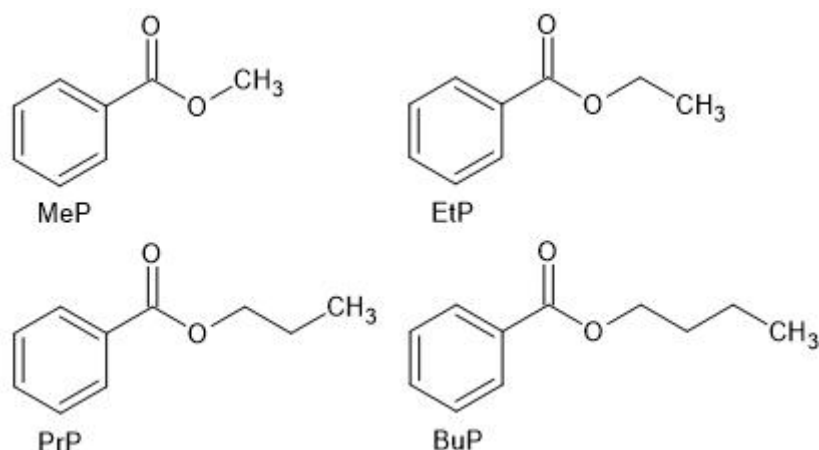


Figura 1 - 11. Estructura química del metilparabeno (MeP), etilparabeno (EtP), propilparabeno (PrP) y butilparabeno (BuP). Elaboración propia.

### F) Benzofenonas

Las benzofenonas constituyen una familia de moléculas caracterizadas por la presencia de dos anillos bencénicos unidos por un grupo carbonilo, diferenciándose entre ellas por diversos sustituyentes y patrones de sustitución (Figura 1 - 12). Los miembros más destacados de esta familia incluyen desde la benzofenona-1 (BP-1) hasta la benzofenona-12 (BP-12). Estos compuestos se utilizan principalmente como filtros UV y están presentes en productos de uso diario como protectores solares, cremas, cosméticos, lacas, lociones, tintes, champús y otros PCP. Además, las benzofenonas se emplean comúnmente en procesos de polimerización, como aditivos plásticos o para prevenir la pérdida de calidad en alimentos [97], [98].

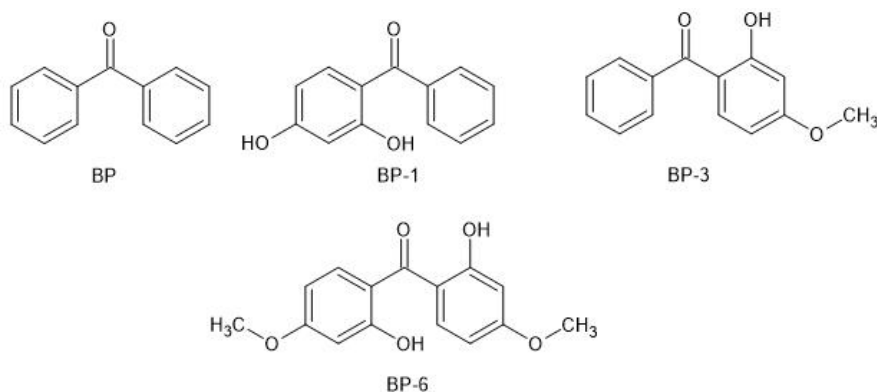


Figura 1 - 12. Estructura química de la benzofenona (BP), 2-4-dihidroxibenzofenona (BP-1), 2-hidroxí-4-metoxibenzofenona (BP-3) y 2,2'-dihidroxí-4,4'-dimetoxibenzofenona (BP-6). Elaboración propia.

La exposición humana a estos filtros ultravioleta (UV) es muy común debido a su presencia habitual en PCPs. La principal vía de exposición es la absorción dérmica resultante del uso de estos productos [99]. No obstante, también se produce una

exposición indirecta a las benzofenonas a través de los vertidos de aguas residuales y durante el baño, por ejemplo, en el mar, afectando igualmente a los individuos que utilizan PCPs sin estos contaminantes [100].

Numerosos estudios han investigado el potencial riesgo para la salud asociado con dicha exposición a las benzofenonas, destacando principalmente sus efectos adversos en la reproducción y el desarrollo infantil, así como su potencial carcinogénico [100,101]. Por ejemplo, se ha encontrado una correlación positiva entre la concentración de BP-3 en la orina y la artrosis [102], y la exposición a altas concentraciones de BP-1 podría estar asociada con la endometriosis [103]. Además, se ha encontrado que BP-3 puede alterar los genes implicados en la esteroidogénesis y las vías hormonales [104], disminuye el peso al nacer de las niñas y aumenta el peso al nacer de los niños [105]. Por su parte, la exposición de peces a benzofenona-2 (BP-2) afecta negativamente a su reproducción, inhibiendo el desarrollo de espermatozoides y ovocitos [106].

#### 1.2.1.3. Plásticos y plastificantes

Los plásticos se fabrican a partir de polímeros orgánicos a los cuales se les añade una serie de aditivos para conferirles unas propiedades determinadas de dureza, flexibilidad o color. En los últimos años, se ha encontrado que algunos de estos aditivos, como el bisfenol A (BPA) o los ftalatos, poseen propiedades de alteración endocrina, con la capacidad de interferir en las acciones de algunas hormonas y, por ende, contribuir a los problemas de salud humana [107].

##### A) Bisfenol A (BPA)

Este compuesto orgánico sintético es un derivado del difenilmetano y los bisfenoles cuyo principal uso es la polimerización en plásticos de policarbonato y resinas epoxi, aunque también se emplea como aditivo, por ejemplo, en papel térmico, del que puede liberarse fácilmente con el calor y el tiempo. Dentro de la familia de los bisfenoles, es el más predominante [108,109]. En la Figura 1 - 13 aparece representada la estructura química del BPA.

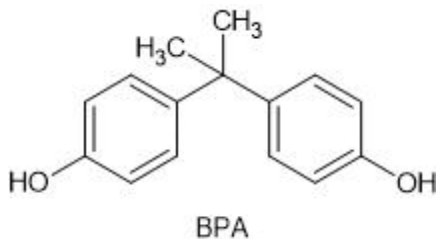


Figura 1 - 13. Estructura química del bisfenol A (BPA). Elaboración propia.

Se trata de uno de los contaminantes más abundantes en los ecosistemas debido a su uso generalizado en bienes de consumo y productos básicos [107]. Se ha

encontrado BPA, por ejemplo, en aguas superficiales y residuales, sedimentos o biota [110–112].

Los seres humanos se encuentran expuestos directa o indirectamente al BPA a través de la inhalación de polvo en la industria [113], la exposición dérmica [114] o la ingesta, representando esta última aproximadamente el 90% de las exposiciones a este compuesto [115]. Este elevado porcentaje de exposición se debe principalmente al empleo de BPA en botellas de policarbonato y latas de alimento o bebidas recubiertas de resina epoxi [116,117].

Respecto a los efectos perjudiciales para la salud del BPA, algunos estudios llevados a cabo en animales han encontrado una relación entre la exposición a este compuesto y la disminución de esperma, la proliferación celular en cáncer de mama o el cambio en el desarrollo de los órganos reproductores masculinos [118]. Además, se ha observado un aumento del riesgo de obesidad [119] y de la resistencia a la insulina [120].

### B) Ftalatos

Estos compuestos son diésteres de los ácidos ftálicos que suelen emplearse como plastificantes que confieren a los plásticos mayor flexibilidad, maleabilidad y elasticidad. Además, también se encuentran en cosméticos, PCPs, envases alimentarios y productos médicos [121]. Su estructura química se presenta en la Figura 1 - 14.

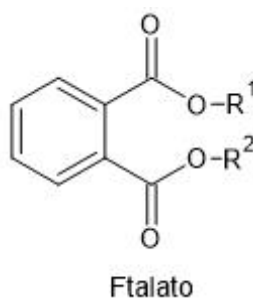


Figura 1 - 14. Estructura química general de un ftalato. Elaboración propia.

Estos productos se generan en elevadas cantidades debido a la diversidad de aplicaciones en las que se utilizan. Por este motivo, los ftalatos han pasado a ser compuestos ubicuos en el medio ambiente, pudiendo encontrarse en las aguas [122], el aire y el polvo [123] o en suelos [124], entre otros. La presencia de ésteres de ftalato en la atmósfera puede producir un riesgo real de exposición por inhalación y contacto con la piel para la salud, pudiendo acumularse en los seres vivos a través de la cadena alimentaria, pasando por el agua y el suelo [125].

Estudios epidemiológicos han encontrado una fuerte relación entre la exposición a ésteres de ftalato y una disminución de la calidad del esperma en varones o el

desarrollo de síntomas de trastorno de déficit de atención con hiperactividad (TDAH) en niños [126]. En particular, la exposición a di(2-etilhexil)ftalato, ftalato de dibutilo, butilbencilftalato y dietilftalato puede causar, por ejemplo, diabetes tipo 2 [127].

#### 1.2.1.4. Fungicidas

Los fungicidas son agentes utilizados para prevenir o erradicar infecciones fúngicas en plantas o semillas, y también se emplean en medicamentos para humanos y animales. Aunque la mayoría de los fungicidas presentan una toxicidad baja o moderada, se ha demostrado que algunos pueden causar toxicidad en el desarrollo y oncogénesis [128]. Los fungicidas azólicos son uno de los principales tipos de fungicidas con efectos conocidos de alteración endocrina [129]. Además, otros fungicidas como el boscalid, el ciprodinil o la iprodiona también han mostrado efectos similares [130].

##### A) Fungicidas azólicos

Los fungicidas azólicos son ingredientes activos comunes en numerosos PCPs, medicamentos de uso humano y veterinario, y pesticidas. Estos compuestos se caracterizan por contener, al menos, una fracción azólica, como un anillo imidazol o triazol [131].

Se ha detectado la presencia de algunos de estos compuestos antifúngicos, como el clotrimazol, el fluconazol, el climbazol y el epoxiconazol (Figura 1 - 15), en aguas residuales, lodos y diversos entornos naturales, especialmente en ecosistemas acuáticos, a menudo en concentraciones preocupantes [132].

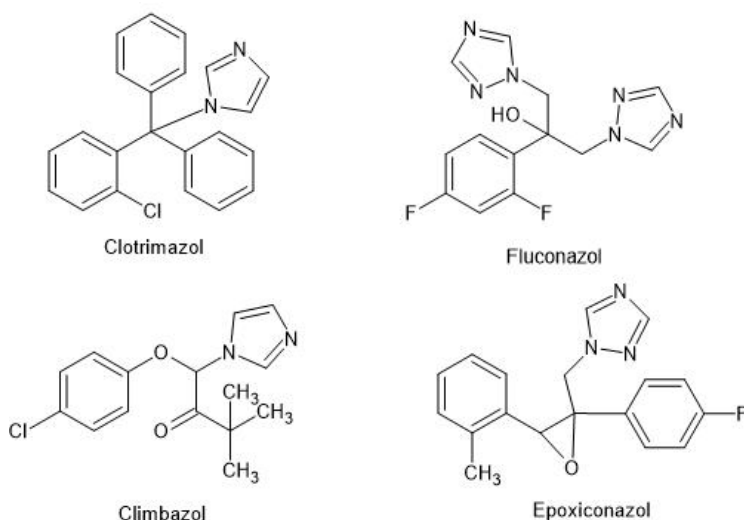


Figura 1 - 15. Estructura química de algunos fungicidas azólicos: clotrimazol, fluconazol, climbazol y epoxiconazol. Elaboración propia.

Algunos de los efectos conocidos de los fungicidas azólicos como disruptores endocrinos son su interferencia en la biosíntesis de hormonas esteroideas al inhibir

enzimas de la vía esteroidogénica y la capacidad para alterar el desarrollo reproductivo, especialmente cuando la exposición se produce durante el embarazo [129]. Como ejemplo de esta interferencia con las hormonas, el flusilazol puede afectar a los niveles de androstenediona y estrona [133].

### B) Compuestos organoestánicos (OTC)

Constituyen un grupo de moléculas organometálicas caracterizadas por la presencia de un átomo de estaño (Sn) unido covalentemente a uno o más sustituyentes orgánicos, tales como metilo, etilo, butilo, propilo o fenilo. Químicamente, estos compuestos se representan mediante las fórmulas tipo  $R\text{Sn}X_3$ ,  $R_2\text{Sn}X_2$ ,  $R_3\text{Sn}X$ ,  $R_4\text{Sn}$ , donde R puede ser cualquier grupo alquilo o arilo, y X una especie aniónica, como haluro, óxido o hidróxido [134]. Ejemplos de OTC incluyen tricloruro de butilestaño, el dicloruro de dibutilestaño o el tributilestaño, cuyas moléculas aparecen representadas en la Figura 1 - 16.

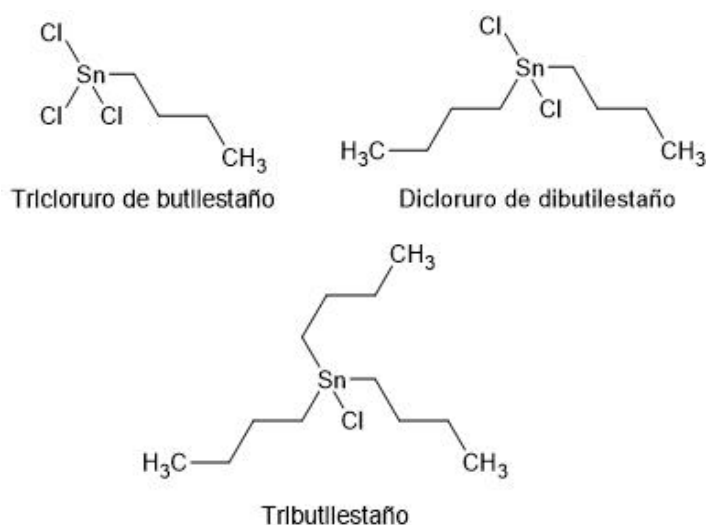


Figura 1 - 16. Estructura química del tricloruro de butilestaño, del dicloruro de dibutilestaño y del tributilestaño. Elaboración propia.

Los OTC tienen una amplia gama de aplicaciones: los OTC mono- y di- sustituidos se utilizan como estabilizantes del policloruro de vinilo (PVC), catalizadores y en el recubrimiento de vidrio, mientras que los OTC trisustituidos se emplean como biocidas y pesticidas, aunque estos usos estén en declive. Finalmente, los OTC tetrasustituidos se utilizan exclusivamente como intermedios en síntesis química. El uso extensivo de OTC como biocidas y en la producción de bienes de consumo resulta en una contaminación continua de los medios acuático y terrestre, exponiendo a los seres humanos a estos compuestos a través de la contaminación, por ejemplo, de pescado y marisco [135].

La exposición a OTC puede provocar daños neurológicos, incluyendo la alteración del sentido del olfato y amnesia, así como efectos hepáticos, tales como la elevación de la actividad de las transaminasas séricas [136]. Particularmente, el tributilestaño puede causar obesidad o esteatosis hepática [137].

#### 1.2.1.5. Agentes farmacéuticos

En este grupo se incluyen productos farmacéuticos como el antiepiléptico carbamazepina y los principios activos de varios antidepresivos (fluoxetina, sertralina, venlafaxina, citalopram, norfluoxetina, difenhidramina, diltiazem). Además, también se encuentran anticonceptivos humanos, como el etinilestradiol, o cualquier fármaco que presente efectos secundarios hormonales, como el naproxeno [32].

Dentro de los agentes farmacéuticos más empleados también se encuentra el diclofenaco, cuya exposición a altas concentraciones está asociada con la alteración de marcadores funcionales renales como la urea, la creatinina, el ácido úrico y las citocinas [138], con cambios drásticos en la actividad enzimática [139] y con la reducción significativa de la velocidad de los espermatozoides [140].

#### A) Carbamazepina

La carbamazepina se sintetiza mediante el uso de 5H-dibenz[b,f]azepina y fosgeno, seguido de una reacción posterior con amoníaco y se emplea generalmente para el tratamiento de trastornos convulsivos y dolor neuropático, aunque también puede utilizarse, por ejemplo, en casos de trastorno bipolar o esquizofrenia [141]. En la Figura 1 - 17 se presenta la estructura química de la carbamazepina.



Figura 1 - 17. Estructura química de la carbamazepina. Elaboración propia.

La exposición humana involuntaria a la carbamazepina se debe principalmente al uso de agua residual tratada (ART) para el riego agrícola [142]. Estudios realizados en diferentes niveles tróficos como algas, cladóceros y peces, indican que este fármaco afecta al sistema reproductor de estas especies. Los efectos observados incluyen cambios en el comportamiento y el crecimiento, modificaciones en la fecundidad, desarrollo de anomalías, alteraciones histológicas en las gónadas y disminución de la hormona cetotestosterona [143].

## B) Estrógenos

Los estrógenos son hormonas endógenas con múltiples actividades fisiológicas. En el cuerpo humano, se encuentran principalmente en tres formas: estrona, estradiol y estriol. Además, el estreol, producido durante el embarazo, y el etinilestradiol, de origen sintético, también son relevantes. Diversas fuentes pueden contribuir a la contaminación ambiental con estrógenos, incluyendo descargas de granjas de animales, mataderos y grandes centros urbanos. Los estrógenos presentes en los excrementos, ya sea por procesos naturales o artificiales (como la terapia hormonal o la anticoncepción) pueden contaminar el agua y el suelo a través de aguas residuales o fertilización [144,145]. La exposición a estos estrógenos, como por ejemplo el 17 $\beta$ -estradiol, puede provocar cáncer de testículos y ovarios, osteoporosis, enfermedades cardiovasculares y estimular la endometriosis [37].

### ❖ Estrona (E):

La estrona es una hormona natural de tipo estrogénico producida principalmente por los ovarios, el tejido adiposo, los fibroblastos de la piel, la placenta y el cerebro [146]. A las mujeres posmenopáusicas que reciben terapia hormonal, se les prescribe comúnmente estrona o estradiol. Este último, puede transformarse también en estrona, lo que resulta en la excreción de este compuesto a través de la orina y las heces, liberándose así al medio ambiente [23,147]. Su composición molecular puede observarse en la Figura 1 - 18.

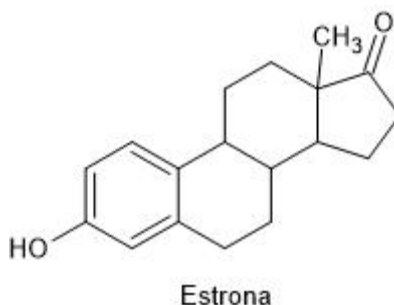


Figura 1 - 18. Estructura química de la estrona. Elaboración propia.

Los altos niveles de estrona en las aguas residuales representan un riesgo significativo, ya que la contaminación por esta hormona puede facilitar procesos como la feminización, la disfunción reproductiva y la carcinogénesis en el entorno circundante [23].

Como se ha comentado previamente, todos estos CDEs expuestos aparecen habitualmente en los ecosistemas acuáticos. Existen diversas rutas a través de las cuales los CDEs pueden llegar al medio acuático, tales como la eliminación de

residuos farmacéuticos y hospitalarios, las EDAR, la lixiviación de productos químicos utilizados en artículos industriales y domésticos (por ejemplo, detergentes y PCPs), y la liberación de residuos pesticidas procedentes de actividades agrícolas [38], las cuales se muestran en la Figura 1 - 19.



Figura 1 - 19. Fuentes de CDEs en el ecosistema acuático. Adaptación de Pironti et al. (2021) [38]

Por ejemplo, los parabenos y otros conservantes empleados en PCPs y cosméticos, las benzofenonas utilizadas en protectores solares o el galaxolide usado en fragancias, se liberan al agua durante su uso y lavado, para después ser descargados al medio acuático por las EDAR. Lo mismo sucede con los medicamentos y los fármacos hormonales, como el ibuprofeno o el 17 $\alpha$ -etinilestradiol, que se excretan por la orina y acaban en el sistema de aguas residuales [148].

Además, se debe tener en cuenta que el agua no es una masa estática, sino que sigue un ciclo que favorece la distribución de estos CDEs. El ciclo urbano del agua incluye todas las formas posibles por las cuales los contaminantes pueden ingresar al medio y ser atenuados en el camino [28]. Así, el agua de las precipitaciones puede arrastrar los contaminantes presentes en los edificios, las calles o los campos de cultivo, que acabarán en las aguas superficiales como ríos o lagos, o infiltrándose en acuíferos que actúan como depósitos de agua potable. El agua de lluvia también puede acabar en el sistema de alcantarillado, donde se mezcla con las aguas residuales domésticas e industriales. Desde allí, puede ser descargada directamente en las aguas superficiales en períodos de precipitaciones abundantes, cuando se supera la capacidad del sistema de alcantarillado, o puede ser tratada en la EDAR. El principal problema es que estas sustancias no se eliminan fácilmente del agua con los tratamientos convencionales de las EDAR, por lo que acabarán siendo vertidas

también junto con los efluentes [28,38]. En la Figura 1 - 20 se presenta un ejemplo de un ciclo urbano del agua genérico.

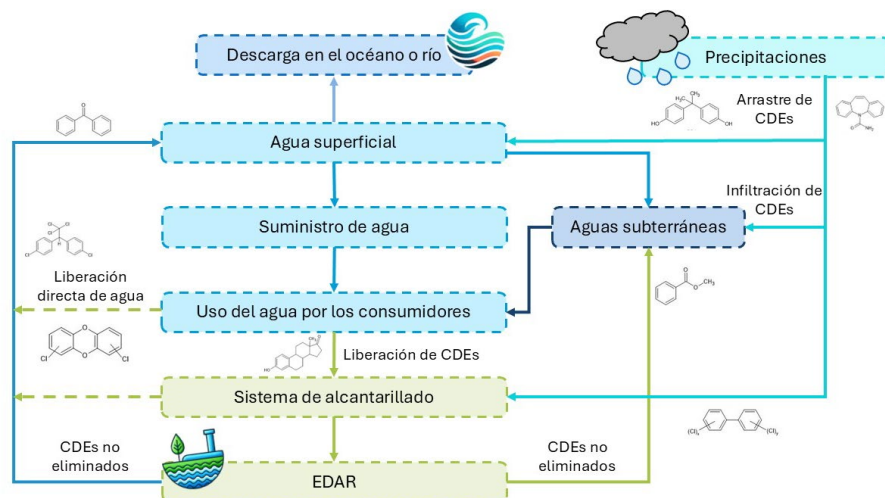


Figura 1 - 20. Esquema de un ciclo urbano del agua genérico. Adaptación de Pal et al. (2014) [28].

En la Tabla 1 - 1 se recoge la abundancia de estos contaminantes en diferentes tipos de receptores acuáticos de diversos países.

Tabla 1 - 1. Concentraciones típicas de los CDEs en el ecosistema acuático.

| Ríos                |                      |           |       |
|---------------------|----------------------|-----------|-------|
| CDEs                | Concentración (ng/L) | País      | Ref.  |
| E                   | 1,01-26,73           | Indonesia | [149] |
| 17β-estradiol       | 1,04-31,25           |           |       |
| BPA                 | 9,76-1070,22         |           |       |
| Triclorocarbanilida | 1,22-290,32          |           |       |
| MeP                 | 4,56-22,33           |           |       |
| BPA                 | 83964,00             | India     | [24]  |
| Triclosán           | 17063,00             |           |       |
| MeP                 | 966,00               |           |       |
| PrP                 | 1430,00              |           |       |
| BuP                 | 104,00               |           |       |
| Lagos               |                      |           |       |
| 17α-etinilestradiol | 84,96                | China     | [26]  |
| BPA                 | 47,43                |           |       |
| Estrona             | 0,46                 |           |       |
| Estriol             | 35,69                |           |       |
| BPA                 | 0,02-3,99            |           |       |
| Triclosán           | 0,24-1,05            | [150]     |       |
| BP-3                | 1,52-5,99            |           |       |

Tabla 1 - 2. Continuación. Concentraciones típicas de los CDEs en el ecosistema acuático.

| Agua de mar                 |                      |                   |       |
|-----------------------------|----------------------|-------------------|-------|
| CDEs                        | Concentración (ng/L) | País              | Ref.  |
| 2,3,4-trihidroxibenzofenona | 57,40                | Rumanía-Mar Negro | [20]  |
| BP-1                        | 74,00                |                   |       |
| BP-3                        | 956,00               |                   |       |
| Salicilato de etilhexilo    | 203,00               |                   |       |
| Bisfenol F                  | 11,20                |                   |       |
| Bisfenol E                  | 16,50                |                   |       |
| BPA                         | 165,00               |                   |       |
| Aguas residuales            |                      |                   |       |
| OP                          | 294,00-1300,00       | Pakistán          | [151] |
| NP                          | 184,60-624,00        |                   |       |
| BPA                         | 324,00-702,00        |                   |       |
| Triclosán                   | 22,60-69,10          |                   |       |
| E                           | 92,40-189,2          |                   |       |
| Estriol                     | 694,00-1776,00       |                   |       |
| 17β-estradiol               | 0,40-15,10           | México            | [152] |
| 17α-etinilestradiol         | 1,30-407,50          |                   |       |
| BPA                         | 1,90-450,00          |                   |       |
| 4-NP                        | 0,40-18,90           |                   |       |
| 4-terc-octilfenol           | 0,70-58,80           | China             | [153] |
| MeP                         | 1482,00              |                   |       |
| EtP                         | 115,00               |                   |       |
| PrP                         | 224,00               |                   |       |
| Triclocarbán                | 481,00               |                   |       |
| Triclosán                   | 295,00               |                   |       |
| BP-1                        | 1740,00              | Rumanía           | [154] |
| 2,3,4-trihidroxibenzofenona | 303,00               |                   |       |
| 4-hidroxibenzofenona        | 55,70                |                   |       |
| BP-3                        | 47,40                |                   |       |
| Aguas subterráneas          |                      |                   |       |
| Estrona                     | 6,00                 | Eslovenia         | [155] |
| BPA                         | 6551,00              |                   |       |
| Bisfenol E                  | 64,00                |                   |       |
| Bisfenol C                  | 17,00                |                   |       |
| BPA                         | 20,80                | China             | [156] |
| NP                          | 39,40                |                   |       |
| E                           | 2,81                 |                   |       |

### 1.2.2. Métodos de detección de CDEs en las aguas

El análisis de la presencia y concentración de los CDEs, tanto en las fuentes de emisión como en las diferentes matrices en las que aparecen (agua, aire y suelos), es de gran importancia para estimar su impacto a largo plazo. Sin embargo, este análisis de CDEs presenta algunas dificultades [157]:

- Las matrices donde se encuentran los CDEs son muy complejas.
- Como se ha visto antes en la Tabla 1 - 1, las concentraciones en las que suelen estar presentes estos contaminantes en el medio son muy bajos (del orden de ppt o ppb).
- Además de los propios CDEs también están presentes isómeros, enantiómeros o diasterómeros que dificultan la diferenciación de compuestos.
- Al tratarse de contaminantes emergentes, muchos de ellos recientemente identificados, no existen métodos analíticos precisos para su correcta identificación y cuantificación.

Las técnicas convencionales más empleadas para la detección, identificación y cuantificación de CDEs en muestras acuosas son los métodos de separación cromatográfica, principalmente la cromatografía de gases (CG) y la cromatografía líquida de alta resolución (HPLC), que pueden estar acopladas a un detector de espectrometría de masas (MS) [157]. La principal ventaja de este detector MS es que permite la identificación de los compuestos en función de su relación masa-carga ( $m/z$ ) y de la abundancia relativa de los iones moleculares y fragmentarios resultantes de la ionización electrónica (IE). De este modo, es posible identificar los compuestos al compararlos con librerías comerciales de espectros de masas [158].

La elección entre CG o HPLC dependen en gran medida de las propiedades de los analitos. En general, la CG se aplica a compuestos volátiles o semivolátiles, que sean gaseosos a temperatura ambiente o tengan puntos de ebullición bajos [157,159]. Para CDEs polares menos volátiles, se puede aplicar una etapa de derivatización, que reduce su polaridad y mejora su volatilidad [160,161]. Sin embargo, el HPLC suele ser la técnica preferida para analizar compuestos polares y sensibles a la temperatura, ya que permiten su detección sin derivatización previa. Aunque el análisis por HPLC puede ser más lento que por CG, el desarrollo de tecnologías como la cromatografía líquida de ultra alta presión (UHPLC), con columnas de partículas de menos de 2  $\mu\text{m}$ , ha permitido acelerar los tiempos de análisis (<5 min) y alcanzar límites de cuantificación más bajos, incluso de 10-50 ng/L [38,157]. Además, los sistemas de HPLC ofrecen una gran versatilidad, pudiendo utilizarse distintas modalidades, como la cromatografía de partición (líquido-líquido), en fase normal, en fase reversa, de interacción hidrofílica, de intercambio iónico, de exclusión por tamaño, quiral y de

afinidad [162]. En la Tabla 1 - 3 se resumen ejemplos de detección de CDEs en diferentes matrices acuosas mediante estas técnicas.

Tabla 1 - 3. Ejemplos de detección de CDEs en aguas con técnicas de cromatografía

| Compuestos                                                          | Técnica de detección empleada            | Pretratamiento                        | Matriz                                                            | Ref.  |
|---------------------------------------------------------------------|------------------------------------------|---------------------------------------|-------------------------------------------------------------------|-------|
| Pesticidas                                                          | CG-MS                                    | Microextracción en fase sólida (SPME) | Aguas superficiales                                               | [163] |
| BPA, fosfato de tributilo y fosfato de tris(2-cloroetilo)           |                                          |                                       | Aguas superficiales, de mar y residuales                          | [164] |
| 17β-estradiol, 17α-etinilestradiol, BPA, 4NP y 4-terc-octilfenol    |                                          |                                       | Aguas residuales                                                  | [152] |
| BPA y 17α-etinilestradiol                                           | HPLC-Detector de fluorescencia (FLD)     | SPE                                   | Aguas superficiales y suministro de agua                          | [165] |
| 14 hormonas esteroideas y BPA                                       | UHPLC-MS/MS                              |                                       | Agua del grifo, aguas superficiales, influente y efluente de EDAR | [166] |
| Hormonas naturales, sintéticas, BPA, alquilfenoles y fitoestrógenos | HPLC-Detector de arreglo de diodos (DAD) |                                       | Agua de río                                                       | [167] |

Un requisito fundamental para un análisis cromatográfico preciso de los CDEs es la preparación adecuada de la muestra. Esta etapa permite extraer eficazmente el contaminante de la matriz ambiental en la que se encuentra. Existen diversas técnicas que pueden emplearse para este fin, como la extracción en fase sólida (SPE), la microextracción líquido-líquido (LLME) o la extracción por microondas (MAE) [157]. Por ejemplo, Hejji et al. (2021) combinaron una técnica MAE y SPE para detectar 24 CDEs en frutas y verduras, con posterior análisis por CG-MS [168].

En el presente estudio se utilizó la técnica de SPE, que permite aislar los analitos sobre una fase sólida, donde quedan retenidos hasta su elución con un disolvente adecuado. La SPE es ampliamente empleada en muestras ambientales, farmacéuticas o alimentarias, y puede realizarse con diversos adsorbentes: óxidos inorgánicos, adsorbentes de baja especificidad y adsorbentes específicos. Estos materiales pueden presentarse en distintos formatos, siendo el cartucho el más común (Figura 1 - 21), aunque también se emplean discos, filtros, placas o columnas de centrifugación [169–171].

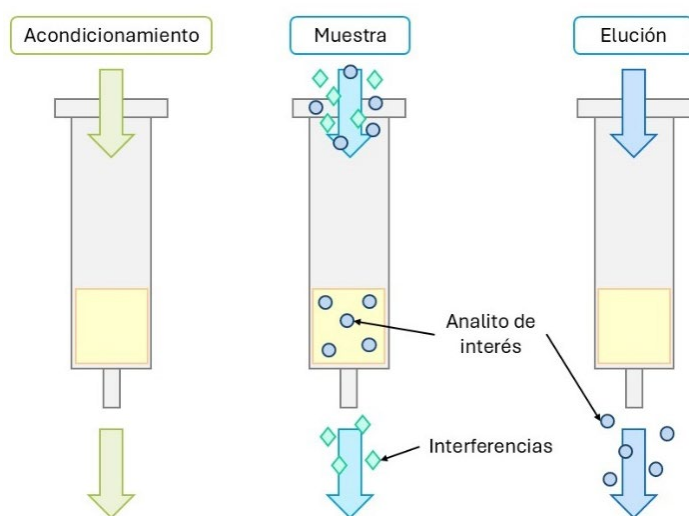


Figura 1 - 21. Representación del proceso de SPE con cartucho. Elaboración propia.

La eficiencia del proceso de SPE depende de muchas variables, (Figura 1 - 22), como la cantidad de adsorbente, el volumen de muestra, el pH o el volumen de elución, lo que hace que el desarrollo del método sea complejo y que la optimización de las variables resulte crítica para obtener la mejor respuesta posible [172]. En la Tabla 1 - 4 se presentan algunos ejemplos de recuperaciones de CDEs en aguas mediante SPE con adsorbentes comerciales.



Tabla 1 - 4. Aplicaciones de la SPE utilizando adsorbentes convencionales para CDEs recuperados de muestras acuosas.

| Compuestos                                                          | Material adsorbente | Técnica de determinación                                                      | Recuperación (%) | Ref.  |
|---------------------------------------------------------------------|---------------------|-------------------------------------------------------------------------------|------------------|-------|
| 24 productos farmacéuticos y PCPs, CDEs y edulcorantes artificiales | Chromabond HR-X     | HPLC acoplada a MS en tándem con ionización por electrospray (HPLC-ESI-MS/MS) | 62,5-113,0       | [176] |
| 25 CDEs: hormonas naturales y sintéticas y bisfenoles               | Polimérico Strata-X | LC-MS/MS                                                                      | 50,0-130,0       | [175] |
| Fármacos, hormonas y BPA                                            |                     | HPLC-DAD                                                                      | 52,3-179,6       | [174] |
| Herbicidas, fungicidas e insecticidas                               | Cartucho MCX        | UHPLC-MS/MS                                                                   | 75,9-112,1       | [173] |

1.2.3. Legislación

El enfoque general de la legislación busca siempre limitar la exposición humana y ambiental a estas sustancias, debido a los efectos potencialmente peligrosos que tienen en la salud y el ecosistema. A continuación, se presenta un resumen de las regulaciones en la Unión Europea (UE) y Estados Unidos (EE. UU.), que se consideran como las mejor desarrolladas y de mayor alcance [177].

### 1.2.3.1. Unión Europea

Las estrategias a largo plazo propuestas por la UE se centran en el desarrollo y la adaptación de instrumentos legislativos y acciones políticas que permitan la identificación de peligros, así como la evaluación y gestión de riesgos asociados a los CDEs [178]. Entre estas estrategias se incluyen:

- **Reglamento de Registro, Evaluación, Autorización y Restricción de Sustancias Químicas (REACH 1907/2006)**: Identifica de forma temprana las propiedades intrínsecas de las sustancias químicas y adopta medidas para evitar efectos negativos sobre la salud humana y el medioambiente, promoviendo su eliminación gradual o restricción [179].
- **Regulación de Plaguicidas (1107/2009)**: Establece las normas aplicables a la autorización de productos fitosanitarios, incluyendo CDEs, con el objetivo de garantizar la protección de la salud humana y animal, así como del medioambiente [180].
- **Regulación de biocidas (528/2012)**: Define una lista de sustancias activas permitidas en la elaboración de biocidas, asegurando que no tengan efectos nocivos en la salud humana o animal ni efectos inaceptables en el medio ambiente. Para la aprobación de nuevas sustancias activas, es obligatorio realizar estudios específicos de toxicidad para evaluar sus propiedades de alteración endocrina [181].
- **Regulación sobre los productos cosméticos (1223/2009)**: Establece las normas que deben cumplir todos los productos cosméticos comercializados para proteger la salud humana. Entre las sustancias prohibidas en productos cosméticos se encuentran CDEs como el isopropilparabeno o la benzofenona [182].

### 1.2.3.2. Estados Unidos

En EE. UU., existen dos entidades encargadas de regular este tipo de sustancias. Por un lado, la Administración de Alimentos y Medicamentos (FDA) se encarga de las principales leyes de la regulación química sobre alimentos y aditivos alimentarios, medicamentos y cosméticos. Por otro lado, la EPA se encarga de las leyes relativas a pesticidas y otros productos químicos comerciales no cubiertos en otros lugares [177]:

- La **EPA** regula los CDEs bajo el **Programa de Evaluación de Disruptores Endocrinos (EDSP)**. La EPA implementa programas que evalúan e investigan los posibles efectos endocrinos asociados con el uso de determinados químicos. Además, toma las medidas necesarias para mitigar los riesgos asociados y garantizar la protección de la salud pública y el medio ambiente. Por ejemplo, en la lista de ingredientes activos para pesticidas aparecen el acefato y el carbaril como sustancias

con potencial para interactuar con los sistemas hormonales de estrógeno, andrógeno o tiroides [183].

- La **FDA** es responsable de garantizar la seguridad de los medicamentos humanos y veterinarios, productos biológicos y dispositivos médicos, así como de la seguridad del suministro de alimentos y cosméticos [184]. Sin embargo, la FDA presenta menos restricciones que la UE, permitiendo, por ejemplo, el uso de NP, BPA, tributilestano, triclosán y algunos ftalatos en materiales en contacto con alimentos [177].

Otras regulaciones menos estrictas incluyen, por ejemplo, la Agencia Nacional de Vigilancia Sanitaria (ANVISA) en Brasil, que controla la producción, comercialización y uso de productos y servicios sujetos a regulación sanitaria [185]. El principal problema que presenta es que, aunque ha llevado a cabo estudios sobre el potencial carcinogénico de compuestos como el glifosato, no dispone de una lista clara de CDEs prohibidos. También destaca el Convenio de Estocolmo sobre Contaminantes Orgánicos Persistentes, que restringe algunos CDEs como el DDT o los PCBs [186].

Como se ha visto, uno de los grandes desafíos pendientes de la identificación y regulación de estos compuestos a nivel global es la falta de criterios unificados, sumado a la dificultad de demostrar los efectos específicos en humanos cuando la exposición es crónica o multifactorial [187].

#### 1.2.4. Tratamientos para la eliminación de CDEs en aguas residuales

Existen diferentes tipos de métodos para eliminar los CDEs en los efluentes de aguas residuales, que pueden dividirse en tres grupos: tratamientos físicos, químicos y electroquímicos, y biológicos [188].

##### 1.2.4.1. *Tratamientos físicos*

###### A) **Sedimentación**

Esta técnica se emplea habitualmente en el tratamiento primario y secundario de las EDAR, aunque resulta bastante ineficiente para la eliminación de CDEs [189]. Por ejemplo, cuando se sometió a un tratamiento de sedimentación un lixiviado de vertedero enriquecido con 100 µg/L de 4-t-octilfenol, 4-n-octilfenol, NP y BPA, y 50 µg/L de dietil ftalato, ftalato de dibutilo, ftalato de butilbencilo y dietilhexil ftalato, se encontró que la distribución sólido-líquido en sedimento/sobrenadante fue bastante inferior al 50% para todos los compuestos, excepto para el NP, donde fue superior al 90% [190].

###### B) **Tecnologías basadas en adsorción**

Estas tecnologías son consideradas las más efectivas y fiables para la eliminación de CDEs presentes en aguas residuales. Además, se caracterizan por su fácil

operación, alta flexibilidad de uso, ausencia de subproductos nocivos y rentabilidad [188].

La eficiencia del proceso de adsorción depende de varios parámetros del adsorbente, como su área específica, la hidrofobicidad o hidrofiliidad de su superficie, la presencia de grupos funcionales y la densidad. En cuanto al adsorbato, sus propiedades más significativas son la solubilidad y el tamaño molecular. Además, otros parámetros como el pH de la solución, la temperatura y otras condiciones operativas también pueden influir significativamente en la adsorción [188].

Entre los adsorbentes más utilizados se encuentran las zeolitas, minerales, estructuras metal-orgánicas, carbón activado, biochar, hidrochar activado, nanotubos de carbono, grafenos, materiales compuestos de carbón activado y nanocompuestos mesoporosos de polímeros y arcilla [191]. El carbón activado es considerado uno de los adsorbentes más efectivos para el tratamiento de aguas debido a su gran área superficial y naturaleza química [188]. Por ejemplo, Ndagijimana et al. (2019) lograron eliminaciones entre el 100% y el 75% de BPA utilizando polvo de carbón activado a partir de una concentración inicial de 40 mg BPA/L [192]. Zhao et al. (2019) encontraron eliminaciones del 99% de BPA, carbamazepina y dietil ftalato en una hora con una concentración inicial de 1 ppm empleando carbón activado granular [193]. Otros adsorbentes, como el óxido de grafeno, presentan menores recuperaciones, por ejemplo, entre el 72% y el 35% para el estriol, partiendo de una concentración inicial de 5 ppm [194].

### C) Tecnologías basadas en membranas y filtración

Las tecnologías basadas en membranas también se presentan como métodos prometedores para la eliminación de CDEs. Aunque estos procesos tienen altos costes asociados, ofrecen algunas ventajas significativas como un amplio rango de selectividad, la capacidad de operar de manera continua, la ausencia de subproductos o metabolitos, y su fácil adaptación a los tratamientos de aguas convencionales. La eliminación de CDEs mediante estas tecnologías se lleva a cabo a través de tres mecanismos principales: exclusión por tamaño, repulsión de carga e interacciones fisicoquímicas, como el peso molecular, la solubilidad en agua y las propiedades electroestáticas [188,195].

Existen diferentes tipos de membranas que se clasifican según el tamaño de poro y el peso molecular de corte, así como la fuerza que controla el transporte de los solutos a través de las fases. Las membranas más empleadas en la eliminación de CDEs son las de microfiltración, ultrafiltración, nanofiltración y ósmosis inversa, ordenadas de mayor a menor tamaño de poro y de menor a mayor presión de trabajo [195].

Como ejemplos de efectividad de estos métodos, Dai et al. (2021) encontraron tasas de rechazo del 53,7%, 69,1%, 79,1% y 91,3% para MeP, EtP, PrP y BeP, respectivamente, utilizando una membrana de nanofiltración con una concentración de parabenos de 1 g/L [196]. Además, Aziz et al. (2020) lograron eliminaciones del 84% y 100% de 17 $\beta$ -estradiol y testosterona, respectivamente, empleando membranas de ósmosis inversa y nanofiltración [197].

#### 1.2.4.2. *Tratamientos químicos y electroquímicos*

##### A) Cloración

La cloración es el método convencional más empleado en procesos de tratamiento de aguas potables y residuales. Se emplea como método de desinfección química para eliminar microorganismos, ya que es capaz de interrumpir la actividad respiratoria de la membrana celular. En cuanto a su uso como método de eliminación de CDEs, su eficacia depende del tipo de contaminante, las dosis de cloro empleadas, el tiempo de contacto y el pH [189]. Por ejemplo, se han encontrado eliminaciones entre el 60-74% para NP, entre el 75-80% para BPA y entre el 77-84% para triclosán, utilizando diferentes dosis de cloración [198]. Sin embargo, también se han reportado eliminaciones inferiores. Noutsopoulos et al. (2015) alcanzaron eliminaciones de aproximadamente el 10% para ibuprofeno y del 20% para el ketoprofeno y etoxilatos de nonilfenol, empleando también diferentes dosis de cloro inicial [199].

##### B) Ozonización

El ozono es un gas altamente reactivo, capaz de oxidar bacterias, materia orgánica y contaminantes en los sistemas de aguas residuales. La optimización de un proceso basado en ozono depende de diversos factores, tales como la cantidad de ozono, la densidad energética aplicada, el tipo de catalizador, la temperatura, el caudal de aire y la presión [189]. Dogruel et al. (2020) reportaron que la eficiencia del proceso de ozonización aplicado a diclofenaco, ibuprofeno, naproxeno, ciprofloxacina, sulfametoxazol, atenolol, propanolol, estradiol, etinilestradiol, carbamazepina, BPA, cafeína, hidroxí diclofenaco, dihidroxí diclofenaco, hidroxí ibuprofeno, paraxantina, dihidroxí carbamazepina, epoxi carbamazepina y acetil sulfametoxazol, fue superior al 80% para 7 de estos compuestos, mientras que 4 mostraron eficiencias entre el 50 y el 80%, y el resto presentaron eliminaciones por debajo del 50% [200].

##### C) Fotocatálisis

La fotocatálisis es un proceso de oxidación que implica la formación de radicales hidroxilo ( $\cdot\text{OH}$ ) mediante la acción de luz UV, utilizando un óxido metálico semiconductor como catalizador. Esta tecnología es capaz de descomponer y mineralizar compuestos persistentes, tanto orgánicos como inorgánicos, en dióxido de carbono ( $\text{CO}_2$ ), agua y compuestos inorgánicos más simples, empleando la luz como fuente de energía. Entre los óxidos metálicos semiconductores más utilizados en fotocatálisis se encuentran el  $\text{TiO}_2$  y el  $\text{ZnO}$ . La eficiencia en la eliminación de CDEs

en aguas residuales mediante este proceso depende de varios factores, como la temperatura, la superficie del semiconductor y la intensidad de la luz seleccionada [188,201]. Por ejemplo, Vela et al. (2019) encontraron eliminaciones entre el 50% y 100% al tratar seis pesticidas con una concentración inicial de 0,3 mg/L de cada uno, utilizando ZnO y añadiendo Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>8</sub> [202].

#### D) Electrocoagulación

La electrocoagulación es una tecnología avanzada que combina métodos convencionales de coagulación, flotación y electroquímica. Este proceso consta de tres pasos [188]:

- Formación del coagulante mediante la disolución de los iones metálicos del electrodo anódico.
- Desestabilización de contaminantes y partículas en suspensión.
- Desemulsificación y agregación de fases insolubles y formación de flóculos.

Los metales más empleados en los procesos de electrocoagulación son el aluminio y el hierro. Estudios previos han reportado eficiencias de eliminación superiores al 80% para concentraciones iniciales de 200 µg/L de E, 17β-estradiol, estriol y 17α-etinilestradiol, empleando electrodos de hierro [203].

#### E) Procesos de oxidación avanzada (EAOPs)

Estos procesos han experimentado mejoras significativas en la última década, principalmente debido a los avances en los materiales de los electrodos y al empleo de fuentes de energía renovables más económicas. El principio de estas técnicas se basa en el uso de ánodos con un elevado potencial de oxidación, que consumen energía eléctrica para degradar los contaminantes. Como resultado, se generan agentes superoxidantes, como los ·OH, en la solución, capaces de mineralizar completamente dichos contaminantes. Sin embargo, los EAOPs son procesos complejos debido a la gran cantidad de parámetros de operación involucrados, tales como el tipo de electrodo, el tiempo de tratamiento, la intensidad de corriente aplicada, así como el pH y la conductividad del medio [188]. Como ejemplo de la eficacia de este método, Calzadilla et al. (2021) lograron ratios de mineralización superiores al 70% en un efluente de tratamiento secundario real dopado con 30 fármacos [204].

### 1.2.4.3. Tratamientos biológicos

#### A) Fangos activos

Pese a que el objetivo fundamental del proceso de fangos activos es la eliminación de la materia orgánica biodegradable presente en las aguas residuales mediante un conjunto de microorganismos que la utilizan como sustrato y la descomponen [10], este tratamiento también ha resultado ser efectivo en la eliminación de CDEs en las

EDAR. Ya en 1974, se reportaron porcentajes de eliminación entre el 83 y el 90% empleando etoxilatos de nonilfenol con una concentración inicial de 5 ppm de cada uno de ellos [205]. Posteriormente, Nakada et al. (2006) encontraron eficiencias de eliminación del 86% para E, 90% para 17 $\beta$ -estradiol y del 100% para estriol con este tratamiento [206]. Más recientemente, se ha investigado la posibilidad de emplear el residuo sólido del tratamiento de fangos activados como adsorbente para eliminar CDEs, alcanzando capacidades de adsorción máximas de 6,14  $\mu\text{g/g}$  de 17 $\beta$ -estradiol y de 7,15  $\mu\text{g/g}$  de 17 $\alpha$ -etinilestradiol [207].

No obstante, a pesar de su potencial, para que el tratamiento convencional de fangos activos pueda implementarse como estrategia específica para la eliminación de CDEs en una EDAR sería necesario realizar ajustes significativos. Estos incluyen el aumento de la cantidad de fango y los tiempos de retención hidráulicos, la reducción de la relación nutrientes/microorganismos y modificaciones estructurales en el diseño de la planta existente [208].

### B) Biorreactores de membrana

Los biorreactores de membrana (MBR) representan un avance prometedor en el tratamiento de aguas, ya que ofrecen mayor flexibilidad para operar a tiempos de retención del fango más prolongados. Esta tecnología combina el tratamiento biológico convencional de fangos activos con un proceso de filtración mediante membranas con diámetros de poro entre 0,02 y 0,4  $\mu\text{m}$ , que permiten separar eficazmente los microorganismos del agua tratada [209]. Los parámetros operativos que influyen en la biodegradación de CDEs con este tratamiento incluyen el tiempo de retención del fango, el tiempo de retención hidráulico, la DQO, la temperatura y el pH [188]. Sözüdoğru et al. (2022) reportaron eliminaciones de entre el 35% y el 100% para carbamazepina, BPA, 17 $\alpha$ -etinilestradiol, triclosán, EtP, MeP,  $\beta$ -estradiol, tonalide, galaxolide y E usando un sistema MBR anóxico/óxico de lámina plana sumergida [210].

### C) Lagunas de aireación

Las lagunas de aireación se presentan como una alternativa viable para el tratamiento de aguas en comunidades rurales, ya que ofrecen gran flexibilidad y son más económicas que otros tratamientos convencionales y avanzados de aguas residuales [188]. Estas lagunas son estanques de poca profundidad, generalmente entre 0,5 y 1 m, que no están diseñados para tratar altas cargas orgánicas. En su interior proliferan bacterias aerobias, protozoos y algas [10]. En cuanto a su eficacia, estudios han demostrado una eliminación del 52,5% de estradiol empleando agua residual real [211].

### D) Tratamientos anaerobios

Los tratamientos anaerobios se emplean habitualmente en aguas residuales con alta carga de materia orgánica biodegradable, ya que aplicar un tratamiento aerobio

en estas condiciones supondría un consumo energético excesivo. No obstante, el principal inconveniente de los procesos anaerobios es su baja velocidad [10]. Estudios que combinan fármacos, como el ibuprofeno o el naproxeno, con CDEs, como el BPA y el NP, han encontrado eliminaciones de estos compuestos entre el 20 y el 80% durante la digestión anaerobia de lodos [212]. Además, Paterakis et al. (2012) alcanzaron eliminaciones totales de estrógenos (E, 17 $\beta$ -estradiol, estriol, estrona-3-sulfato y 17 $\alpha$ -etinilestradiol) en fango procedente del tratamiento primario del 53% en condiciones mesofílicas y del 51% en condiciones termofílicas [213].

#### E) Tratamientos basados en otros microorganismos

Se han estudiado numerosos microorganismos para evaluar su capacidad de degradar CDEs, incluyendo hongos, levaduras, bacterias, microalgas y, más recientemente, consorcios microbianos formados varias especies [195].

En este sentido, Lzaod et al. (2022) investigaron la degradación de 4,4'-dihidroxibifenilo mediante las enzimas oxidativas extracelulares, particularmente lacasas, producidas por el hongo *Trametes versicolor*, alcanzando eliminaciones del 65% en tan solo 20 minutos [214]. Asimismo, Kasonga et al. (2019) reportaron eficiencias de eliminación del 89,77%, 95,80% y 91,41% para carbamazepina, diclofenaco e ibuprofeno, respectivamente, partiendo de una concentración inicial de 1 ppm de cada compuesto tras 24 horas de tratamiento con un consorcio fúngico compuesto por *Aspergillus niger*, *Mucor circinelloides*, *Trametes polyzona*, *Trichoderma longibrachiatum* y *Rhizopus microsporus* [215].

En cuanto al uso de levaduras para la eliminación de CDEs, Debs et al. (2019) emplearon biomasa de levadura residual procedente de la industria del etanol para eliminar 17 $\alpha$ -etinilestradiol y E mediante bioadsorción, obteniendo eficiencias de eliminación de entre el 50% y el 60% para el primero, y del 30% al 70% para el segundo, con concentraciones de contaminante comprendidas entre 1 y 5 mg/L [216].

Respecto la capacidad de algunas bacterias para degradar contaminantes, Eltoukhy et al. (2020) demostraron que *Pseudomonas putida* fue capaz de eliminar aproximadamente el 60% de bisfenol B y el 67% de bisfenol F, partiendo de una concentración inicial de 100 mg/L. Sin embargo, obtuvieron menores eficiencias de degradación con bisfenol S (30%), ftalato de dibutilo (20%) y ftalato de dietilhexilo alrededor (18%) [217]. Por otro lado, Palma et al. (2021) aislaron cepas bacterianas de fangos procedentes de una EDAR capaces de eliminar 17 $\alpha$ -etinilestradiol. Entre ellas se encontraron *Acinetobacter bouvetii*, *Acinetobacter kookii*, *Pantoea agglomerans* y *Shinella zoogloeoides*, que alcanzaron porcentajes de degradación del 47%, 55%, 64% y 35%, respectivamente, a partir de una concentración inicial de 13 mg/L tras 168 horas [218].

Aunque en secciones posteriores se profundizará en la aplicación de microalgas para eliminar CDEs en aguas residuales, cabe destacar que existen trabajos que han obtenido resultados satisfactorios en este campo. Así, Ahn et al. (2024) obtuvieron eliminaciones del 87,1%, 80,1%, 79,2% y 77,1% con *Chlamydomonas mexicana*, *Chlorella vulgaris*, *Chlorella sorokiniana* y *Scenedesmus obliquus*, respectivamente, a partir de una concentración inicial de 0,2 mg/L de bisfenol AP (BPAP) en 12 días. Al aumentar la concentración a 1 mg BPAP/L, las eliminaciones fueron 86,5%, 86,0%, 56,5% y 78,9%, respectivamente [219]. Además, Huang et al. (2019) alcanzaron eliminaciones del 65% y el 92% partiendo de 1 y 0,5 mg/L de 17 $\beta$ -estradiol en 10 días empleando *Chlorella* [220].

Como ejemplo de consorcio de microorganismos, Fu et al. (2023) consiguieron una eliminación del 57,5% de 20 mg BPA/L en 5 días con un consorcio de la microalga *Chlorella pyrenoidosa* con la bacteria *Acinetobacter* sp. [221].

Pese a la eficacia demostrada de los procesos mencionados en apartados previos para eliminar diferentes CDEs, muchos presentan limitaciones prácticas o económicas. Por ejemplo, los métodos de adsorción presentan un problema a la hora de eliminar el adsorbente, que se encuentra concentrado en contaminantes, de forma segura para el medioambiente. Por otro lado, la aplicación de microfiltración o ultrafiltración como tratamiento terciario para la eliminación de CDEs implica costes energéticos muy elevados para mantener una velocidad de paso adecuada a través de la membrana. En cuanto a la cloración, se sabe que es eficiente en procesos con grupos funcionales fenol y amino y sus derivados, pero no reacciona con cetonas y alcoholes, lo que la hace un proceso demasiado selectivo. Asimismo, actualmente existen pocas instalaciones operativas basadas en procesos de oxidación avanzada debido a su alto costo en instalaciones a gran escala. Las desventajas que presentan los procesos de fangos activos ya se han comentado previamente. Finalmente, si se emplea un proceso de tratamiento anaerobio para eliminar CDEs, el biosólido generado no podrá ser reciclado en terrenos agrícolas o vertederos, debido a su contenido en contaminantes recalcitrantes [208].

Frente a estas limitaciones, las tecnologías basadas en microorganismos - especialmente en microalgas - han surgido como una alternativa versátil y prometedora para el tratamiento de CDEs presentes en aguas residuales. Entre sus ventajas, las microalgas presentan una elevada eficiencia fotosintética, rápido crecimiento y un valor económico sustancial. Asimismo, son capaces de eliminar simultáneamente diferentes contaminantes, además de nutrientes, sin necesidad de energía adicional o costes elevados, ya que la fuente de nutrientes para la producción de biomasa puede proceder de recursos reciclables, fijan CO<sub>2</sub> durante la fotosíntesis y la biomasa cosechada puede convertirse en productos de alto valor añadido, que incluyen biodiesel y fertilizantes [222]. Debido a este potencial, la presente tesis se centra en la evaluación de la eliminación de CDEs mediante microalgas.

## 1.3. Métodos basados en microalgas para la eliminación de CDEs de las aguas residuales

### 1.3.1. Microalgas y cianobacterias

Las microalgas se definen estrictamente como microorganismos unicelulares, eucariotas y fotosintéticos que, habitualmente, habitan en ambientes acuáticos, tanto marinos como de agua dulce. Aunque las cianobacterias son organismos procariotas y, por lo tanto, no son verdaderas algas, suelen incluirse dentro de este término debido a sus similitudes fisiológicas y ecológicas con las microalgas eucariotas. En este sentido, las cianobacterias, también conocidas como algas verdeazuladas, representan el grupo de microalgas procariotas, mientras que las microalgas eucariotas incluyen principalmente a las diatomeas y a las algas verdes.

En cuanto a su origen evolutivo, se estima que la fotosíntesis surgió hace aproximadamente 3,5 mil millones de años en las cianobacterias, particularmente en los océanos. Posteriormente, tras un proceso evolutivo de entre 1 y 1,5 mil millones de años, aparecieron los organismos eucariotas [223,224].

Estos organismos unicelulares fotosintéticos tienen la capacidad de generar biomasa a partir de sustancias inorgánicas y elementos minerales completamente oxidados, mediante la conversión de energía luminosa durante la fotosíntesis. Además, su producción no genera contaminación ambiental, contribuyen a la fijación de CO<sub>2</sub> mientras generan oxígeno, requieren un consumo relativamente bajo de agua y puede cultivarse en terrenos no aptos para la agricultura [225].

Las microalgas presentan diversas aplicaciones en distintos sectores, entre ellas [226]:

- Productos de alto valor añadido, como carotenoides, ácidos grasos poliinsaturados y ficobiliproteínas. La Figura 1 - 23 muestra un enfoque de biorrefinería para la extracción de diversos compuestos bioactivos a partir de biomasa microalgal.
- Biomasa completa para nutraceuticos, alimentos y piensos. Las microalgas contienen sustancias bioactivas con propiedades antioxidantes, antibacterianas, antivirales, antitumorales, regenerativas, antihipertensivas, neuroprotectoras e inmunoestimulantes [225].
- Extractos o biomasa procesada para producir biofertilizantes y biocombustibles. Estos organismos pueden emplearse como materia prima en la producción de biodiésel, biogás, biohidrógeno, bioetanol, butanol, bioaceite, carbón vegetal e incluso energía [227].
- Microorganismos vivos utilizados en procesos de biorremediación de aguas residuales, suelos y gases. Gracias a su capacidad de crecimiento

en diversas condiciones y tipos de aguas residuales, las microalgas se utilizan en procesos de descontaminación y tratamiento ambiental [3].

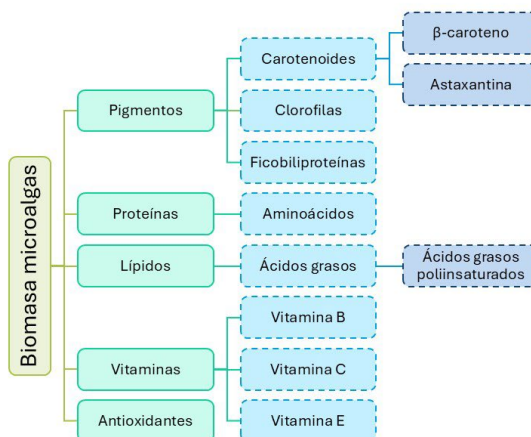


Figura 1 - 23. Biorrefinería de extracción de componentes a partir de biomasa microalgal. Adaptación de Koyande et al. (2019) [228].

### 1.3.2. Cultivo de microalgas

El cultivo de microalgas con fines de investigación se inició en 1890, cuando científicos holandeses aislaron el alga verde *Chlorella* y lograron mantenerla en cultivo puro en el laboratorio. Décadas más tarde, en la década de 1970, comenzó el cultivo de microalgas a nivel comercial, destacando la producción de *Arthrospira* y *Chlorella* [224].

El crecimiento de microalgas está influenciado por diversos factores y parámetros, como la composición del medio de cultivo, la fuente e intensidad de luz, la disponibilidad de nutrientes y CO<sub>2</sub>, la temperatura, el pH, la salinidad, la concentración de oxígeno y la agitación del cultivo. Estos elementos juegan un papel crucial en la optimización del crecimiento y la productividad de las microalgas [229].

#### ❖ **Temperatura:**

La temperatura es uno de los factores ambientales más determinantes en el crecimiento de las microalgas, ya que influye en su tasa de crecimiento, tamaño celular, composición bioquímica y requerimientos de nutrientes. La temperatura óptima para su desarrollo varía entre 15°C y 35°C, dependiendo de la cepa, aunque algunas especies mesofílicas pueden tolerar temperaturas superiores a 40°C. Temperaturas por debajo del rango óptimo reducen la tasa de crecimiento, mientras que el sobrecalentamiento es particularmente crítico, ya que puede provocar daños celulares irreversibles [225,229].

Por ejemplo, *Monoraphidium* sp., cultivada en aguas residuales industriales, mostró un crecimiento óptimo durante siete días a temperaturas entre 25°C y 35°C. Sin embargo, cuando la temperatura alcanzó 40°C, su crecimiento comenzó a disminuir gradualmente a partir del segundo día de cultivo [230]. De manera similar, *Chaetoceros* sp. exhibió un buen crecimiento en el rango de 25°C a 35°C, pero su desarrollo se redujo a 40°C. En el caso de *Tetraselmis suecica*, temperaturas superiores a 30°C resultaron letales, con su máxima tasa de crecimiento específica registrada a 25°C. Por otro lado, *Nannochloropsis* sp. creció de manera eficiente entre 25°C y 35°C, aunque su tasa de crecimiento disminuyó a medida que aumentaba la temperatura [231].

#### ❖ **Nutrientes:**

La composición bioquímica de las microalgas está fuertemente influenciada por las condiciones de cultivo, especialmente en escenarios de limitación de nutrientes. Un medio de cultivo óptimo debe proporcionar los elementos inorgánicos esenciales, entre ellos fósforo (P), nitrógeno (N) y hierro (Fe), fundamentales para el crecimiento celular. En este sentido, los macronutrientes clave para el crecimiento autotrófico incluyen el carbono (C), el N y el P, ya que desempeñan un papel crucial en la biosíntesis de moléculas esenciales.

Además, para un desarrollo adecuado de las microalgas, el medio de cultivo debe contener oligoelementos en concentraciones traza, como el Mg, S, Ca, Na, Cl, Fe, Zn, Cu, Mo, Mn, B y Co. La mayoría de estos micronutrientes pueden encontrarse de manera natural tanto en aguas residuales como en agua de mar, lo que permite su aprovechamiento en cultivos de microalgas [225,231].

##### ○ **Carbono:**

Aproximadamente el 50% de la biomasa de microalgas está compuesta por C. Las microalgas pueden utilizar CO<sub>2</sub> y aniones bicarbonato (HCO<sub>3</sub><sup>-</sup>) como fuentes de carbono inorgánico para la fotosíntesis; sin embargo, no pueden asimilar el ion carbonato (CO<sub>3</sub><sup>2-</sup>) como fuente de carbono.

Por otro lado, algunas especies de microalgas pueden utilizar fuentes de carbono orgánico en su crecimiento, los cuales incluyen azúcares (glucosa, galactosa y fructosa), alcoholes (glicerol y etanol) y ácidos (acetato). En cuanto a las concentraciones de carbono requeridas, estas deben ser elevadas, ya que el C es el principal constituyente de las sustancias orgánicas sintetizadas por las células, como carbohidratos, proteínas, ácidos nucleicos, vitaminas y lípidos [231,232].

##### ○ **Nitrógeno:**

El N es el segundo elemento más abundante en la biomasa de microalgas, después del C, representando entre 1% y 14% de su peso seco. Las microalgas

pueden asimilar nitrógeno inorgánico a partir de diversas fuentes, incluyendo nitrato ( $\text{NO}_3^-$ ), nitrito ( $\text{NO}_2^-$ ) y amonio ( $\text{NH}_4^+$ ). Generalmente, el amonio es la opción preferida, ya que su asimilación requiere un menor gasto energético, siempre que se trate de la fuente de nitrógeno preferencial para la especie cultivada. Además, algunas microalgas son capaces de utilizar fuentes de N orgánico disuelto, como aminoácidos y urea.

El N asimilado se transforma en proteínas, ácido ribonucleico (ARN) y ADN, los cuales constituyen aproximadamente 70-90%, 10-15% y 1-2% del nitrógeno celular total de la microalga, respectivamente. En condiciones de déficit de nitrógeno, las microalgas alteran su metabolismo, favoreciendo la síntesis de lípidos y carbohidratos (polisacáridos), además de experimentar cambios en la coloración celular, los cuales se deben a una disminución en la cantidad de clorofilas y un aumento en la acumulación de carotenoides [225,231,232].

#### ○ **Fósforo:**

El fósforo es otro nutriente esencial para el crecimiento de las microalgas y para diversas actividades metabólicas celulares, representando entre el 0,05% y el 3,3% de su peso seco. Este elemento es fundamental en la síntesis de ácidos nucleicos, como ADN y ARN, necesarios para la expresión genética, así como en la producción de adenosín trifosfato (ATP), la principal molécula de almacenamiento y transferencia de energía. Además, el P es un componente principal de los fosfolípidos, los cuales constituyen la mayor parte de la membrana celular.

Las microalgas asimilan preferentemente P inorgánico, el cual se encuentra en forma de fosfatos ( $\text{PO}_4^{3-}$ ), hidrogenofosfato ( $\text{HPO}_4^{2-}$ ) y dihidrogenofosfato ( $\text{H}_2\text{PO}_4^-$ ), siendo los ortofosfatos la principal fuente de este nutriente.

Al igual que ocurre con el N, la composición de la biomasa se ve afectada por la disponibilidad de fósforo, influyendo en el contenido de lípidos y carbohidratos. Además, las microalgas cuentan con un mecanismo de acumulación de reservas intracelulares de fósforo, permitiéndoles almacenarlo y utilizarlo en condiciones de agotamiento de fosfato en el medio [225,231,232].

#### ❖ **CO<sub>2</sub>:**

Otro factor clave en el crecimiento de las microalgas es la disponibilidad de  $\text{CO}_2$ . Parte del carbono fijado por las microalgas se utiliza para el mantenimiento celular y el crecimiento, mientras que el resto se almacena en diferentes formas según la especie. Se estima que para generar 1 kg de biomasa se requieren entre 1,8 y 2 kg de  $\text{CO}_2$ , lo que hace que la concentración de este gas en el aire (0,03%) sea insuficiente para un cultivo eficiente. Por ello, para optimizar la fotosíntesis, es necesario enriquecer el medio de cultivo con una fuente adicional de carbono, ya sea en forma

de sales, como el bicarbonato, o mediante la inyección de aire con mayor concentración de  $\text{CO}_2$  [225,231].

En este sentido, Aditya et al. (2023) estudiaron el efecto de distintas concentraciones de  $\text{CO}_2$  en el crecimiento de *Scenedesmus* sp., observando que el incremento en la concentración de  $\text{CO}_2$  favorecía el crecimiento de la microalga. Sin embargo, también detectaron que a medida que aumentaba la disolución de  $\text{CO}_2$ , el pH del medio disminuía debido a la naturaleza ácida de este gas, lo que resalta la importancia de mantener un equilibrio adecuado en las condiciones del cultivo [233].

#### ❖ **pH y salinidad:**

El pH es un factor fundamental en el cultivo de microalgas, ya que influye en múltiples procesos celulares, como el metabolismo energético, la síntesis de proteínas, la estructura y función de los orgánulos celulares, entre otros. Además, el pH no solo afecta directamente a las microalgas, sino que también determina la solubilidad de los minerales y el  $\text{CO}_2$  en el medio de cultivo.

La variación de pH en el medio está influenciada por su composición, capacidad tampón, cantidad de  $\text{CO}_2$  disuelto, temperatura y actividad metabólica de las células. A medida que las microalgas metabolizan los nutrientes, el pH puede cambiar. Por ejemplo, cuando las microalgas consumen  $\text{NH}_4^+$ , se liberan protones que acidifican el medio, al igual que ocurre con la disolución de  $\text{CO}_2$ , que se convierte en ácido carbónico.

Cada especie de microalga tiene un rango específico de tolerancia al pH, lo cual afecta directamente en su crecimiento. Sin embargo, en términos generales, los valores óptimos para el cultivo de microalgas suelen situarse entre un pH neutro y ligeramente alcalino (7-10), ya que en estas condiciones el  $\text{CO}_2$  se captura de manera más eficiente de la atmósfera, favoreciendo la producción de biomasa. No obstante, cuando el pH supera 9,5 la cantidad de clorofila tiende a disminuir [225,231,234]. Por ejemplo, en el caso de *C. sorokiniana*, se ha determinado que el pH óptimo para su crecimiento en medio PE-001A es 6, observándose una reducción del crecimiento en rangos de pH entre 7 y 9 [235]. Con *C. vulgaris*, se encontró que el pH óptimo para maximizar el crecimiento en un biorreactor en medio Bristol 3 N estaba entre 6,5 y 7 [236].

El pH también influye en la disponibilidad de los nutrientes presentes en el medio de cultivo [231]:

- **Carbono:** Un aumento del pH, causado por la acumulación de  $\text{OH}^-$  durante la fijación fotosintética de  $\text{CO}_2$ , desplaza el equilibrio del carbono inorgánico hacia la formación de  $\text{CO}_3^{2-}$ , una fuente poco accesible para las microalgas. Por otro lado, una disminución del pH favorece la presencia de  $\text{CO}_2$ , que es

la fuente preferente de C, aunque este puede liberarse a la atmósfera, disminuyéndose en el medio de cultivo la concentración de este nutriente.

- **Nitrógeno:** Si la fuente de nitrógeno es  $\text{NH}_4^+$ , un pH elevado reduce la concentración de nitrógeno disponible para las microalgas, ya que favorece la conversión de  $\text{NH}_4^+$  en amoníaco, que puede volatilizarse y perderse del medio de cultivo debido a la aireación.
- **Fósforo:** Valores altos de pH pueden provocar la precipitación de fosfatos (fosfato de calcio, fosfato de hierro y fosfato de aluminio), reduciendo así la disponibilidad de este nutriente esencial.

Dado el impacto del pH en el crecimiento de las microalgas y la disponibilidad de nutrientes, es crucial monitorearlo y ajustarlo durante el cultivo. Para minimizar las fluctuaciones de pH, se pueden emplear soluciones tampón; sin embargo, su uso en sistemas de cultivo a gran escala es inviable debido a los elevados costos de producción. Una alternativa más eficiente es el control del pH mediante la inyección de aire atmosférico o enriquecido en  $\text{CO}_2$ , ya que la disolución de este gas en el medio contribuye a reducir el pH [225].

Otro factor relevante en el cultivo de microalgas es la salinidad, especialmente en cultivos abiertos, donde la evaporación tiende a aumentar su concentración. Algunas especies, en particular las de agua dulce, presentan una tolerancia muy limitada a variaciones en la salinidad. Un estudio realizado por Haris et al. (2022) analizó el efecto de diferentes concentraciones de salinidad (0, 10, 20, 30 y 40 ppt de NaCl) en el crecimiento de *Tetraselmis chuii*, *C. vulgaris* e *Isochrysis galbana*. Se observó que *T. chuii* logró crecer en todas las concentraciones de salinidad excepto para 0 ppt, aunque con menor densidad celular a 10 y 20 ppt en comparación con 30 y 40 ppt. En el caso de *C. vulgaris*, la especie mostró una mejor adaptación a todas las concentraciones de salinidad, alcanzando su máximo crecimiento a 10 ppt. Finalmente, *I. galbana* creció en todas las concentraciones de salinidad excepto a 0 ppt, registrando los valores máximos de crecimiento a 24 ppt y 30 ppt [237].

#### ❖ **Intensidad de la luz, longitud de onda y fotoperiodo:**

La intensidad lumínica es un factor clave en la fase fotoquímica de la fotosíntesis, ya que influye directamente en la absorción de luz por las moléculas de clorofila, la síntesis de ATP y la fotólisis del agua. En términos generales, la fotosíntesis es el proceso mediante el cual los organismos fotoautótrofos convierten el  $\text{CO}_2$  y el agua en polisacáridos y oxígeno, empleando la energía de la luz [238].

La cantidad de luz que reciban los cultivos de microalgas está directamente relacionada con la fijación del C. Sin embargo, la fotosíntesis solo aumenta con la intensidad lumínica hasta alcanzar un punto de saturación, donde se llega a la velocidad máxima del proceso. Más allá de este punto, el exceso de luz puede inducir fotoinhibición, un fenómeno que altera el fotosistema II, afectando el transporte de

electrones y la reducción de nicotinamida adenina dinucleótido fosfato oxidada (NADP+) a nicotinamida adenina dinucleótido fosfato reducida (NADPH) [225].

En cuanto a las longitudes de onda aprovechables por las microalgas, estas se encuentran en el rango de 400 a 700 nm, correspondiente al 50% de la radiación solar, con intensidades óptimas entre 800 y 1000 W/m<sup>2</sup> [225].

Por otro lado, los ciclos de luz y oscuridad (fotoperiodos) también influyen en la eficiencia fotosintética, la productividad de biomasa y la composición metabólica de las microalgas. Un aumento en la frecuencia del ciclo luz/oscuridad puede mejorar la producción de biomasa y la eficiencia fotosintética, aunque su impacto varía según la especie cultivada [225,239].

#### ❖ **Agitación:**

La mezcla juega un papel fundamental en el equilibrio de gases y el mantenimiento del pH en los cultivos de microalgas. Además, contribuye a la distribución homogénea de los nutrientes en el medio, evita la sedimentación celular y promueve el desplazamiento de las células entre zonas iluminadas y oscuras, lo que optimiza la eficiencia fotosintética. No obstante, una mezcla excesiva puede generar estrés mecánico en las células, dañarlas y, en consecuencia, reducir su tasa de crecimiento.

La agitación del medio de cultivo se realiza comúnmente mediante aireación con burbujas de gas enriquecido en CO<sub>2</sub>, agitación mecánica o una combinación de ambas estrategias [231].

#### 1.3.2.1. *Métodos y sistemas de cultivo*

Las condiciones para el cultivo de microalgas pueden clasificarse en tres tipos según la fuente de C y la disponibilidad de luz: fotoautotrófico, heterotrófico y mixotrófico [225,240].

- **Crecimiento fotoautótrofico:** Las microalgas utilizan el CO<sub>2</sub> como fuente de C inorgánica y la luz como fuente de energía para sintetizar compuestos orgánicos a través de la fotosíntesis. Este método es el más económico y ecológico, ya que favorece un mayor secuestro de CO<sub>2</sub>.
- **Crecimiento heterótrofo:** En este tipo de cultivo, las microalgas dependen de una fuente de C orgánico en ausencia de luz, obteniendo energía a través de rutas respiratorias y fermentativas. A diferencia del crecimiento fotoautotrófico, las microalgas cultivadas bajo estas condiciones requieren una menor relación superficie/volumen, lo que facilita su cultivo en biorreactores cerrados.
- **Crecimiento mixotrófico:** Este método combina la asimilación de CO<sub>2</sub> y la utilización de C orgánico de manera simultánea para la producción de

biomasa y metabolitos, mediante procesos tanto respiratorios como fotosintéticos.

Los sistemas de cultivo de microalgas pueden clasificarse en sistemas abiertos y cerrados.

#### A) Sistemas de cultivo abiertos

Los sistemas de cultivo en abierto presentan varias ventajas, entre ellas su menor costo de construcción y mantenimiento, su viabilidad para la producción a gran escala y su menor consumo energético en comparación con los sistemas cerrados. No obstante, también presentan desafíos significativos, como un alto riesgo de contaminación y una menor capacidad para controlar los parámetros de crecimiento y las condiciones de cultivo. A nivel mundial, las microalgas más comúnmente cultivadas en estanques abiertos pertenecen a los géneros *Arthrospira* y *Chlorella* [241].

Las configuraciones más comunes de estos sistemas incluyen los raceway y los estanques circulares [234].

#### ❖ Raceway:

También conocidos como estanques de algas de alta tasa (HRAP), los raceway son estanques poco profundos diseñados con una pared central que divide el flujo en dos canales dispuestos en un bucle cerrado (Figura 1 - 24). El cultivo de microalgas en estos sistemas es agitado de manera continua, alcanzando un flujo turbulento generado por diferentes dispositivos, como bombas, elevadores de aire o ruedas de paletas, siendo estas últimas las más utilizadas.



Figura 1 - 24. Estanques abiertos para el cultivo de microalgas. Fuente: Pal et al. (2018) [242]

A pesar de sus ventajas en términos de costos y escalabilidad, estos sistemas presentan algunas limitaciones. Una de sus principales desventajas es la imposibilidad de controlar la temperatura y la iluminación, lo que los hace altamente dependientes de las condiciones climáticas. En climas cálidos, la alta evaporación puede provocar pérdidas significativas de  $\text{CO}_2$ , mientras que, en climas fríos, el crecimiento de las microalgas puede verse inhibido.

Además, debido a la necesidad de mantener una baja profundidad para maximizar la exposición a la luz, estos sistemas requieren una gran superficie para cultivar volúmenes significativos de biomasa. La poca profundidad es esencial porque la luz incidente se atenúa progresivamente a medida que penetra en el medio, quedando completamente absorbida en el fondo del estanque y generando zonas oscuras que limitan la eficiencia fotosintética.

Para mejorar la productividad de la biomasa, se suele incorporar aireación adicional, utilizando aire puro o enriquecido con  $\text{CO}_2$ , lo que no solo favorece el crecimiento de las microalgas, sino que también ayuda a regular el pH del medio de cultivo [243].

#### ❖ Estanques circulares:

Los estanques circulares son uno de los sistemas de cultivo de microalgas a gran escala más antiguos y se basan en los estanques empleados en el tratamiento de aguas residuales. Se trata de estanques circulares con un agitador pivotante central (Figura 1 - 25). El diseño de estos sistemas limita el tamaño del estanque a unos 10000  $\text{m}^2$ , ya que con sistemas más grandes la mezcla uniforme con un brazo giratorio no es posible [241].



Figura 1 - 25. Estanque circular para el cultivo de microalgas. Fuente: Y. Shen et al. (2009) [244].

## B) Sistemas de cultivo cerrados

Los sistemas de cultivo cerrados incluyen los fotobiorreactores, que consisten en vasijas diseñadas para contener el cultivo y que están equipadas con fuentes controladas de  $\text{CO}_2$  y luz. Estos sistemas presentan diversas ventajas en comparación con los cultivos abiertos, como una mayor eficiencia en el uso del espacio, un mejor control de los parámetros de cultivo, un menor riesgo de contaminación y una mayor productividad.

Sin embargo, su implementación a gran escala presenta desafíos significativos, ya que requiere costos de construcción elevados y un mayor consumo energético, lo que limita su viabilidad para la producción masiva [234]. La Figura 1 - 26 presenta una clasificación de los distintos tipos de fotobiorreactores utilizados en el cultivo de microalgas.

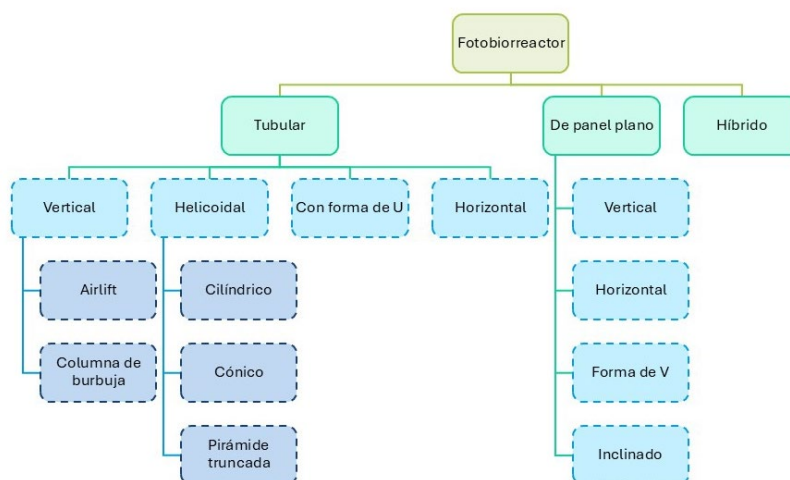


Figura 1 - 26. Clasificación de los fotobiorreactores. Adaptación de Rehman et al. (2022) [234]

### ❖ **Fotobiorreactor tubular:**

Los fotobiorreactores tubulares son los más utilizados en el cultivo de microalgas debido a su alta productividad de biomasa en períodos de cultivo y cosecha relativamente cortos. Están compuestos por tubos fabricados con materiales transparentes, lo que mejora la eficiencia en la captación de la luz. Además, estos sistemas cuentan con tecnologías de bombeo que facilitan la circulación del cultivo a través de los tubos, así como conexiones para la inyección de gas enriquecido en  $\text{CO}_2$ .

Existen diversas configuraciones de fotobiorreactores tubulares, entre las que se incluyen los tubos verticales (Figura 1 - 27 (a)), que abarcan los reactores de columna de burbuja y los de tipo airlift, así como los reactores de tubo horizontal (Figura 1 - 27(b)), los helicoidales y, más recientemente, los de forma en U. La disposición y

geometría del fotobiorreactor juegan un papel fundamental en la conversión de energía luminosa, especialmente cuando se emplean en cultivos al aire libre, donde su orientación con respecto al sol influye directamente en la eficiencia fotosintética [245].



Figura 1 - 27. Izquierda: fotobiorreactor tubular vertical. Fuente: Huo et al. (2018) [246]. Derecha: fotobiorreactor tubular horizontal. Fuente: Alaswad et al. (2015) [247].

#### ❖ **Fotobiorreactor de panel plano:**

Los fotobiorreactores de panel plano están diseñados con materiales transparentes para mantener condiciones óptimas de iluminación, al igual que los fotobiorreactores tubulares. Pueden recibir luz de fuentes naturales o artificiales, ya sea de manera externa o interna. Una de las principales ventajas es su alta relación superficie/volumen, lo que permite una mayor exposición a la luz. Además, su diseño permite su disposición estratégica para maximizar la exposición a las fuentes de luz externa. En la Figura 1 - 28 se presenta un fotobiorreactor de panel plano.

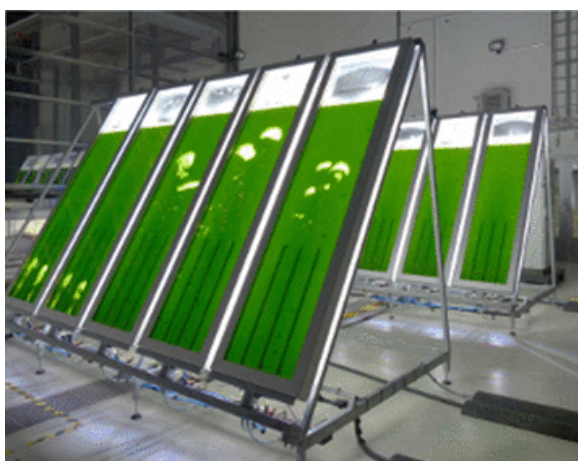


Figura 1 - 28. Fotobiorreactor de panel plano. Fuente: Koller et al. (2018) [248]

Para lograr una adecuada mezcla del cultivo, los fotobiorreactores planos modernos utilizan aireación, inyectando una mezcla gaseosa a través de un tubo de aire perforado dentro del medio de cultivo. Esta estrategia reduce los requerimientos energéticos y materiales en comparación con los sistemas que emplean bombas mecánicas.

Uno de los principales inconvenientes de estos sistemas es el ensuciamiento, fenómeno que ocurre cuando las células de microalgas se adhieren a la superficie interna de las paredes. Esto puede bloquear a la penetración de la luz hacia las capas más profundas del cultivo [249].

#### ❖ **Fotobiorreactor híbrido:**

Los fotobiorreactores híbridos se diseñan mediante la combinación de dos o más tipos de fotobiorreactores con el objetivo de optimizar el rendimiento del cultivo de microalgas. Dado que cada tipo de fotobiorreactor presenta limitaciones específicas, los sistemas híbridos buscan aprovechar las ventajas individuales de cada configuración [249].

Por ejemplo, Deprá et al. (2019) propusieron un fotobiorreactor híbrido que combina una estructura tubular iluminada acoplada a un reactor de columna de burbuja (Figura 1 - 29) [250].

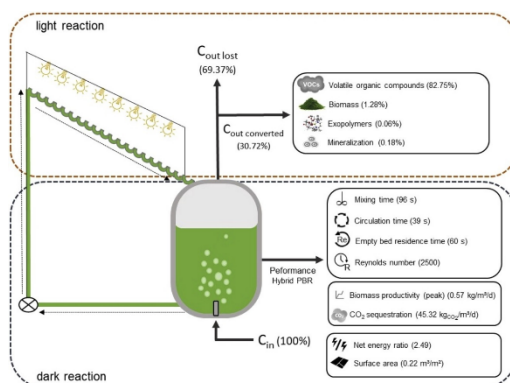


Figura 1 - 29. Ejemplo de fotobiorreactor híbrido. Fuente: Deprá et al. (2019) [250].

#### 1.3.2.2. Cultivo de microalgas en aguas residuales

El cultivo de microalgas en aguas residuales para la eliminación de CDEs ofrece diversas ventajas frente a los procesos tradicionales de cultivo y a los procesos convencionales de depuración [6]:

- Las microalgas pueden crecer utilizando directamente los nutrientes presentes en las aguas residuales, sin necesidad de suplementos adicionales. Por ejemplo, Tran et al. (2021) cultivaron *Chlorella variabilis* en agua residual doméstica recogida en un río de Vietnam, alcanzando

una concentración final de biomasa de 1,52 g/L en fotobiorreactores de 5 L en 14 días [251]. Asimismo, Ling et al. (2019) también crecieron *S. obliquus* en agua residual bruta y agua procedente del proceso de fangos activados de diferentes plantas depuradoras de China. Así, lograron concentraciones de biomasa entre 2 y 3 g/L en 6 días [252].

- Las microalgas son capaces de asimilar nutrientes de las aguas residuales hasta niveles muy bajos, lo que permite cumplir con normativas de vertido y reutilización. En el estudio de Hawrot-Paw et al. (2020), *Chlorella minutissima* cultivada en aguas residuales de acuicultura logró una reducción del 87,9% del NT y del 99,1% del PT en 10 días [253]. Por otro lado, Arias et al. (2018) utilizaron *Scenedesmus* sp. en fotobiorreactores de 30L con agua residual del tratamiento secundario combinada con digestato de digestión anaerobia, obteniendo una eliminación completa de amonio y fosfatos, así como reducciones del 58% en nitratos y del 78% en DQO en 8 días de tiempo de retención [254].
- La capacidad de las microalgas de eliminar CDEs permite reducir los costos de depuración. Bano et al. (2021) lograron eliminaciones del 92% de estradiol, 75% de diclofenaco y 79% de triclosán en 13 días, utilizando un consorcio de seis tipos de microalgas dominado por *Chlorella* sp., *Merismopedia* sp., *Closteriopsis* sp. y *Scenedesmus* sp. [255]. De manera similar, Li et al. (2020) alcanzaron eficiencias de eliminación del 89,9% de 17 $\beta$ -estradiol y del 76,6% de cobre en 12 días empleando *Scenedesmus dimorphus* [256].
- La biomasa cosechada del cultivo de microalgas en aguas residuales puede revalorizarse en productos de alto valor añadido, como biogás, biocombustibles, fertilizantes, piensos para animales, etc.

Entre las especies más empleadas para la eliminación de contaminantes en aguas residuales, debido a su rápido crecimiento, bajos costos de producción y alta tolerancia a condiciones extremas o de estrés, destacan aquellas pertenecientes a los géneros *Chlorella* y *Scenedesmus*. No obstante, otras cepas como *Desmodesmus* sp., *Heterochlorella* sp., *Nannochloris* sp. o *Selenastrum capricornutum* también han demostrado un gran potencial para este propósito [3].

En la Tabla 1 - 5 se recogen algunas de las últimas aplicaciones de microalgas en el campo de la eliminación de CDEs.

Tabla 1 - 5. Aplicación de sistemas basados en microalgas para la eliminación de CDEs.

| Especie                                            | CDEs                    | C <sub>inicial</sub> | Duración  | Eliminación | Ref.  |
|----------------------------------------------------|-------------------------|----------------------|-----------|-------------|-------|
| Clase<br><i>Chlorococcales</i><br>y cianobacterias | OP                      | 3,5<br>µg/L          | 195 min   | 100,0%      | [257] |
|                                                    | Nonilfenol<br>técnico   | 15 µg/L              |           |             |       |
|                                                    | 4-NP                    | 10 µg/L              |           |             |       |
|                                                    | BPA                     | 10 µg/L              |           |             |       |
|                                                    | 17β-estradiol           | 49 µg/L              |           |             |       |
| <i>Nannochloris</i> sp.                            | E                       | 35 µg/L              | 7 días    | 30,0%       | [258] |
|                                                    | 17α-<br>etinilestradiol | 38 µg/L              |           | 70,0%       |       |
|                                                    | Testosterona            | 42 µg/L              |           | 25,0%       |       |
|                                                    | BPA                     | 192<br>µg/L          |           | 45,0%       |       |
|                                                    | Triclosán               | 34 µg/L              |           | 100,0%      |       |
|                                                    | Ácido salicílico        | 185<br>µg/L          |           | 60,0%       |       |
|                                                    |                         |                      |           |             |       |
| <i>Raphidocelis<br/>subcapitata</i>                | 17β-estradiol           | 0,1-1,5<br>mg/L      | 4 días    | 84,5-88,8%  | [259] |
|                                                    | Dietilestilbestrol      |                      |           | 51,7-88,0%  |       |
| <i>Phaeocystis<br/>globosa</i>                     | NP                      | 0,5-2,5<br>mg/L      | 5 días    | 66,4%       | [260] |
| <i>Nannochloropsis<br/>oculata</i>                 |                         |                      |           | 74,8%       |       |
| <i>Dunaliella salina</i>                           |                         |                      |           | 69,9%       |       |
| <i>Platymonas<br/>subcordiformis</i>               |                         |                      |           | 82,4%       |       |
| <i>S. obliquus</i>                                 | E                       | 5 µg/L               | 15 días   | 91,0%       | [261] |
|                                                    | 17β-estradiol           |                      |           | 99,0%       |       |
| <i>C. vulgaris</i>                                 | E                       |                      |           | 52,0%       |       |
|                                                    | 17β-estradiol           |                      |           | 99,0%       |       |
| <i>C. sorokiniana</i>                              | TBBP-A                  | 0,3-1,5<br>mg/L      | 10 días   | 22,0-28,0%  | [262] |
| <i>Chlorella</i> PY-ZU1                            | 17α-<br>etinilestradiol | 1 mg/L               | 9 días    | 88,0%       | [263] |
| <i>C. vulgaris</i>                                 | MeP                     | 1-80<br>mg/L         | 6 días    | 100,0%      | [264] |
| <i>S. quadricauda.</i>                             | 17α-<br>etinilestradiol | 15<br>mg/L           | 10,5 días | 58,0%       | [265] |

### 1.3.3. Mecanismos de eliminación de CDEs

Particularmente, la biorremediación de CDEs del medio acuático empleando microalgas envuelve varios mecanismos: bioadsorción, bioacumulación, biodegradación y fotodegradación; que aparecen en la Figura 1 - 30 [1].

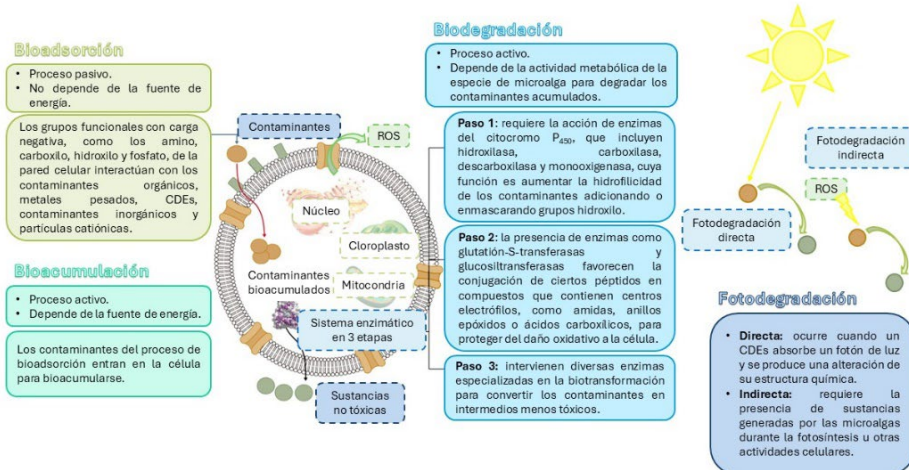


Figura 1 - 30. Biorremediación de contaminantes con microalgas. Adaptación de Abdelfattah et al. (2023) [1].

El mecanismo óptimo de eliminación de los CDEs vendrá dado por las propias características de los contaminantes y de la microalga empleada [266].

### A) Bioadsorción

La bioadsorción de CDEs es un proceso físico y no-metabólico, mediante el cual los contaminantes se adsorben en la pared celular o sobre las sustancias poliméricas extracelulares (EPS). Estas EPS, excretadas por las células y liberadas al medio, están compuestas por proteínas, lípidos, polisacáridos y ácidos nucleicos, y su presencia acelera la bioadsorción de los contaminantes.

El proceso de bioadsorción se basa en la transferencia de materia, en el que un compuesto se desplaza desde una fase líquida y se adhiere a la superficie de un sólido. Este fenómeno ocurre hasta alcanzar un equilibrio dinámico entre la sustancia adsorbida por la célula y su concentración residual en el medio. Las células pueden actuar como bioadsorbente tanto en estado vivo como muerto.

La pared celular de las microalgas está compuesta por celulosa, alginatos, lípidos y proteínas, proporcionando una variedad de grupos funcionales como hidroxilo, fosfato, amino, sulfonato, carboxilo y tiol. Estos grupos facilitan la interacción electroestática con los contaminantes, favoreciendo su retención en la superficie celular.

La eficiencia de la bioadsorción depende de varios factores, incluyendo las propiedades de la pared celular, como tamaño, carga, composición de EPS y grado de hidrofobicidad, así como de las propiedades fisicoquímicas de los contaminantes, tales como hidrofobicidad, carga y pH del medio [1,266,267].

## B) Bioacumulación

La bioacumulación es un proceso dinámico mediante el cual los CDEs son transportados al interior de las células de microalgas. Este mecanismo requiere energía metabólica y es más lento que la bioadsorción, su etapa predecesora. Además, puede ocurrir simultáneamente con la absorción de nutrientes. La captación de CDEs por las microalgas puede llevarse a cabo a través de varias vías:

- **Difusión pasiva:** Los CDEs se trasladan desde una zona de mayor concentración extracelular hacia una de menor concentración intracelular, sin requerir energía. Sin embargo, debido a la hidrofobicidad de la membrana celular, solo los contaminantes apolares, de bajo peso molecular y solubles en lípidos pueden atravesarla.
- **Difusión pasiva facilitada:** En este caso, los CDEs ingresan a la célula con la ayuda de proteínas transportadoras, lo que permite el paso de moléculas polares a través de la membrana.
- **Captación activa:** Este mecanismo requiere energía, ya que los contaminantes se transportan en contra del gradiente de concentración, alcanzando concentraciones intracelulares superiores a las del medio.

Uno de los principales inconvenientes de la bioacumulación de determinados CDEs es que puede estimular la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS). Dentro de las células pueden formarse radicales libres, como  $\cdot\text{OH}$ , superóxido ( $\cdot\text{O}_2^-$ ), perhidroxilo ( $\cdot\text{HO}_2$ ) y oxígeno singlete ( $^1\text{O}_2$ ), así como compuestos no radicales, como el peróxido de hidrógeno ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ), que regulan el metabolismo celular, pero en exceso pueden causar daño oxidativo a biomoléculas, lo que provoca disfunción celular y, en última instancia, muerte celular. Como mecanismo de defensa frente al estrés oxidativo, las microalgas pueden activar procesos de desorción, liberando los CDEs previamente bioacumulados.

Diversos parámetros pueden afectar al proceso de bioacumulación, incluyendo el pH del medio, el tiempo de contacto, la temperatura y la concentración de los contaminantes [1,266].

## C) Biodegradación

La biodegradación es el mecanismo más eficaz para la eliminación de contaminantes en aguas residuales, ya que permite la transformación y descomposición de moléculas complejas en compuestos más sencillos. En comparación con la bioadsorción y la bioacumulación, este proceso es capaz de reducir la toxicidad de los CDEs tanto dentro de las células como en el medio.

La biodegradación puede clasificarse en dos tipos:

- **Degradación metabólica:** Los contaminantes funcionan como donantes o aceptores de electrones y pueden ser utilizados como fuente de carbono por las microalgas.
- **Cometabolismo:** La degradación de los contaminantes ocurre gracias a enzimas que catalizan los sustratos presentes en el medio.

Además, la biodegradación puede llevarse a cabo tanto en el interior como en el exterior de la célula o en ambos sitios simultáneamente. En el medio extracelular, los CDEs se fragmentan, mientras que, en el interior celular, los intermedios generados en la ruptura se descomponen en productos más simples y menos tóxicos.

El proceso de biodegradación intracelular consta de varias fases. En la primera de ellas, las enzimas del citocromo P<sub>450</sub> degradan los CDEs mediante hidroxilación o por la incorporación de grupos funcionales a través de procesos de oxidación, reducción o hidrólisis. En la segunda etapa, la concentración de glutatión S-transferasa aumenta, catalizando la conjugación del glutatión con compuestos que contienen grupos amida, anillo epóxido y carboxilo. Este proceso protege a la célula del estrés oxidativo y convierte los contaminantes en sustancias más hidrofílicas y menos tóxicas. En la última fase participan diversas enzimas también para reducir la toxicidad de los CDEs.

Por otro lado, la biodegradación extracelular está influenciada por la presencia de EPS y enzimas extracelulares. Las EPS pueden formar un biofilm, atrapando las enzimas extracelulares y facilitando la degradación de los contaminantes en el medio externo.

La biodegradación de CDEs depende de varios factores como las características de los contaminantes, la especie de microalga utilizada, la vía enzimática de eliminación y las condiciones ambientales.

Finalmente, es importante destacar que los cambios de pH del medio y la producción de oxígeno durante la fotosíntesis pueden favorecer la formación de ROS, lo que puede influir en la biodegradación de los contaminantes [1,266,267].

#### D) Fotodegradación

La fotodegradación de contaminantes puede ocurrir a través de dos mecanismos: directa e indirecta. La fotodegradación directa se produce cuando el CDE absorbe un fotón de luz, lo que provoca cambios en su estructura química sin la intervención de la microalga. Mientras que la fotodegradación indirecta de los CDEs es facilitada por sustancias químicas generadas por las microalgas durante la fotosíntesis u otras actividades celulares. Estas sustancias incluyen materia orgánica disuelta y sensibilizadores inorgánicos, los cuales contribuyen a la formación de radicales libres como  $^1\text{O}_2$ ,  $\cdot\text{O}^2$ , carbonato ( $\text{CO}_3^-$ ), peroxilo ( $\text{ROO}\cdot$ ), materia orgánica disuelta en

estado excitado triplete ( $^3\text{DOM}^*$ ) y  $\cdot\text{OH}$  que pueden degradar los CDEs del medio [266].

## 1.4. Biorrefinería

El concepto de biorrefinería es análogo al de una refinería convencional de petróleo, en la que biomasa se transforma en múltiples productos tales como compuestos químicos comercializables, biocombustibles y materiales diversos. El diseño de estas biorrefinerías debe orientarse hacia la obtención del máximo número de productos y beneficios a partir de una única materia prima, considerando la escasez de recursos naturales y el impacto medioambiental [268].

Como se ha mencionado anteriormente, las microalgas contienen una alta concentración de proteínas, lípidos y carbohidratos, característica que las convierte una materia prima excelente para obtener una amplia variedad de productos [268]. Dichos productos poseen interés para diversas industrias, incluyendo la farmacéutica, nutracéutica, cosmética y de energías renovables. Entre los productos de alto valor añadido derivados de las microalgas destacan las vitaminas, los carotenoides, los esteroides, las proteínas, los lípidos o los polisacáridos. Muchos de estos compuestos poseen propiedades muy beneficiosas, como actividades antioxidantes, antiinflamatorias y anticancerígenas, lo que les otorga un gran potencial en aplicaciones biomédicas y farmacéuticas. Además, las microalgas pueden ser empleadas para producir otros productos energéticos de alto valor añadido, tales como biogás, bioetanol, biodiésel o biofertilizantes [269]. En la Figura 1 - 31 se ilustra un ejemplo de aprovechamiento integral en un sistema de cultivo de biomasa microalgal.

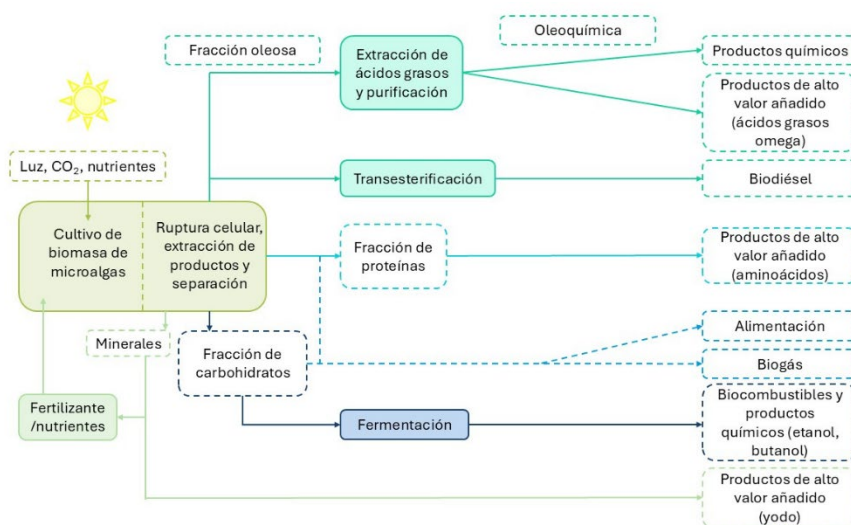


Figura 1 - 31. Biorrefinería de microalgas. Adaptación de Chew et al. (2017) [268].

Además de la obtención de estos productos de alto valor añadido, las microalgas también presentan importantes capacidades de protección medioambiental que pueden integrarse perfectamente en el concepto de biorrefinería. Estas capacidades incluyen el secuestro de  $\text{CO}_2$  mediante la fotosíntesis, la biorremediación y especialmente el tratamiento de aguas residuales. Como se ha comentado previamente, las microalgas son especialmente efectivas para eliminar materia orgánica, nutrientes y contaminantes emergentes como los CDEs de los efluentes de aguas residuales [269]. Al incorporar estas propiedades medioambientales dentro del modelo de biorrefinería, la integración del tratamiento de aguas residuales con la producción energética a partir de biomasa microalgal podría mejorar significativamente la sostenibilidad y reducir los costes operativos asociados a la depuración, al mismo tiempo que disminuye el consumo energético [270].

Un ejemplo práctico de este concepto es la planta de tratamiento de aguas residuales de Algal Enterprises (Australia), aplicable a diversos tipos de aguas residuales: municipales, industriales y agrícolas. En este sistema, microalgas autóctonas utilizan la radiación para llevar a cabo la fotosíntesis en un fotobiorreactor cerrado. Posteriormente, la biomasa generada se somete a co-digestión anaerobia para producir biogás, que finalmente es convertido en electricidad [8].

Con el objetivo de integrar los sistemas basados en microalgas para la eliminación de CDEs dentro del concepto de biorrefinería, era fundamental no solo centrarse en la descontaminación del agua, sino también en la valorización de la biomasa generada. En el caso de la presente tesis, dicha valorización se abordó mediante la conversión de la biomasa algal en un biocombustible renovable, concretamente biogás, lo que permite avanzar hacia un modelo más sostenible y circular de tratamiento de aguas residuales.

#### 1.4.1. Producción de biogás a partir de microalgas

El biogás se considera uno de los biocombustibles más prometedores para mitigar la crisis energética y el cambio climático. Su producción se basa en el proceso de digestión anaerobia (DA), en el cual la materia orgánica compleja es degradada por microorganismos en ausencia de oxígeno, generando productos ricos en energía denominados biogás. El biogás obtenido por DA está compuesto principalmente por  $\text{CH}_4$  en un 55-70% y  $\text{CO}_2$  en un 30-45%, además de pequeñas cantidades de  $\text{H}_2\text{S}$  (50-2000 ppm),  $\text{H}_2\text{O}$ ,  $\text{O}_2$  y trazas de hidrocarburos. Una vez purificado, el  $\text{CH}_4$  puede emplearse para generar calor o electricidad, licuarse para producir metanol, comprimirse para su uso en transporte o inyectarse a la red de gas natural [271,272].

La DA puede llevarse a cabo con una amplia variedad de materias primas biodegradables, siempre que no contengan compuestos tóxicos para los microorganismos. De hecho, la combinación de diferentes sustratos puede aumentar la producción de biogás. Entre estas fuentes de biomasa utilizadas se incluyen

microalgas, residuos alimentarios, residuos agrícolas, purines y estiércol animal, residuos avícolas, residuos sólidos urbanos, residuos industriales, residuos forestales y algunos cultivos energéticos específicos [271,273].

La DA se desarrolla en cuatro fases, en las que interactúan diferentes grupos de microorganismos [272,273]:

- **Hidrólisis:** En esta etapa, las bacterias hidrolíticas degradan polímeros complejos como carbohidratos, proteínas y lípidos en monómeros más simples (azúcares, aminoácidos y ácidos grasos de cadena larga), por la acción de enzimas hidrolíticas, como amilasa, celulasa, lipasa, proteasa y pectinasa.  
La velocidad de degradación depende mucho de la complejidad de los polímeros. Por ejemplo, mientras que los carbohidratos se hidrolizan en pocas horas, los lípidos y las proteínas pueden tardar varios días. Además, los sustratos ricos en lignina o lignocelulosa se degradan muy lentamente y pueden limitar esta fase.
- **Acidogénesis:** Las bacterias acidogénicas transforman los productos de la hidrólisis en ácidos grasos volátiles (AGV) de cadena corta (C1-C5). Además de ácidos como el acético, propiónico, fórmico y láctico, también se obtienen alcoholes (etanol y metanol), cetonas (glicerol y acetona),  $\text{CO}_2$ ,  $\text{H}_2$  y  $\text{NH}_3$ . Esta etapa suele ser muy rápida.
- **Acetogénesis:** Los AGV y los alcoholes se convierten en acetato,  $\text{CO}_2$  y  $\text{H}_2$  gracias a la acción de las bacterias acetogénicas.
- **Metanogénesis:** Es la etapa final de la DA y la llevan a cabo las arqueas metanogénicas. Las bacterias metanogénicas emplean  $\text{H}_2$  y  $\text{CO}_2$  (bacterias hidrogenotróficas) o acetato (bacterias acetoclásticas) para producir  $\text{CH}_4$  y  $\text{CO}_2$ .

El uso de microalgas como sustrato para la producción de biogás ha sido ampliamente estudiado desde los años 60, siendo Golueke et al. (1957) el pionero empleando *Chlorella* sp. y *Scenedesmus* sp [274]. Sin embargo, estos primeros experimentos alcanzaron bajos rendimientos de biogás debido a la pared celular de las microalgas, que dificulta el acceso de los microorganismos anaerobios a la materia orgánica y a la baja relación entre el carbono y el nitrógeno (C/N), lo que genera acumulación de amonio e inhibición del crecimiento de las bacterias metanogénicas [275].

Entre las ventajas que presenta el uso de esta biomasa para DA se encuentran la posibilidad de emplear aguas residuales o agua marina para su cultivo y de reciclar nutrientes, menores costes operativos, menor consumo de energía y producción sostenible de biogás. Adicionalmente, las microalgas generan un rendimiento de metano mayor que otras fuentes de biomasa; sobre todo respecto a la biomasa lignocelulósica y con lignina, que son menos biodegradables [271].

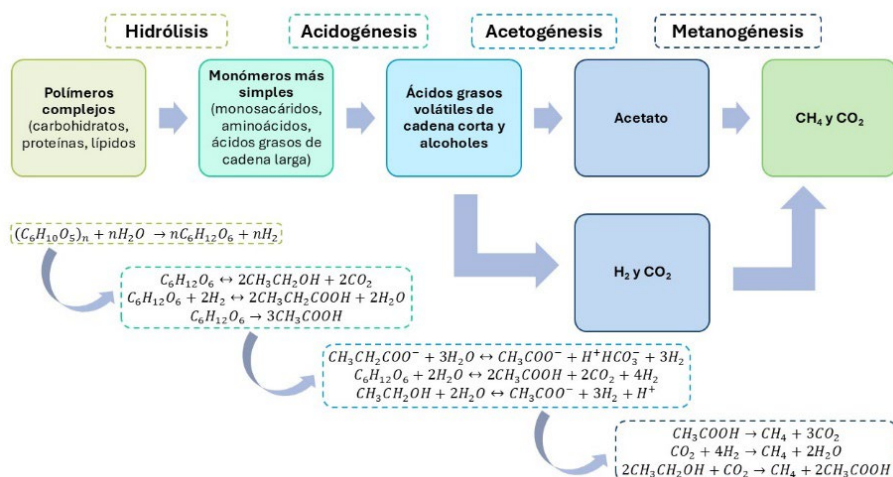
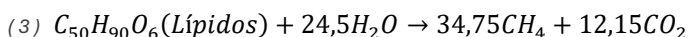
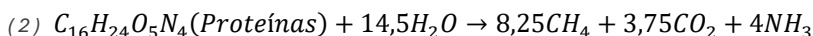
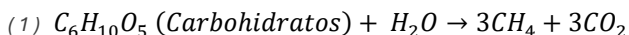


Figura 1 - 32. Descomposición de la biomasa durante el proceso de digestión anaerobia. Adaptación de Uddin et al. (2023) [273].

La elección de la especie de microalga es un factor determinante para optimizar la producción de biogás. Las microalgas más adecuadas deben cumplir una serie de características: tener una pared celular fina o inexistente, una velocidad de crecimiento elevada, una alta tolerancia al estrés y una composición bioquímica favorable. La producción de metano está directamente relacionada con la composición bioquímica de la biomasa, como se observa en las relaciones estequiométricas que aparecen en las ecuaciones (1), (2) y (3).



Dado que los lípidos producen más metano que los carbohidratos y las proteínas, la productividad de biogás dependerá de la composición de la biomasa. Esta, a su vez, dependerá de diversos factores bióticos y abióticos, como las condiciones de cultivo, las variaciones estacionales y la disponibilidad de nutrientes [271].

En la Tabla 1 - 6 se presentan ejemplos de la producción de metano obtenida con diferentes especies de microalgas, donde se observan esas variaciones comentadas previamente.

Tabla 1 - 6. Producción de metano con diferentes especies de microalgas.

| Microalgas                           | T <sup>a</sup><br>(°C) | Tiempo<br>(días) | Producción de<br>metano (mL/gSV) | Ref.  |
|--------------------------------------|------------------------|------------------|----------------------------------|-------|
| <i>C. vulgaris</i>                   | 35                     | 34               | 308                              | [276] |
| <i>Nannochloropsis<br/>gaditana</i>  |                        |                  | 228                              |       |
| <i>S. dimorphus</i>                  |                        |                  | 397                              |       |
| <i>Artrospira<br/>Platensis</i>      | 38                     | 32               | 481                              | [277] |
| <i>Chlamydomonas<br/>reinhardtii</i> |                        |                  | 587                              |       |
| <i>Dunaliella salina</i>             |                        |                  | 505                              |       |
| Mezcla de<br>microalgas              | 35                     | 45               | 188,6                            | [278] |
| <i>C. vulgaris</i>                   | 35                     | 66               | 180-249                          | [279] |
| Mezcla de<br>microalgas              | 37                     | 100              | 200-330                          | [280] |
| <i>Tribonema</i> sp.                 | 35                     | 39               | 293                              | [281] |
| <i>S. dimorphus</i>                  | 35                     | 20               | 199                              | [282] |
| <i>Chlamydomonas</i><br>sp.          | 38                     | 20               | 478                              | [283] |
| <i>C. vulgaris</i>                   | 36                     | 30               | 369                              | [284] |
| <i>C. minutissima</i>                |                        |                  | 340                              |       |
| <i>C. pyrenoidosa</i>                |                        |                  | 464                              |       |

Además, el proceso de DA está influenciado por múltiples factores, entre los que destacan la relación C/N, la carga orgánica, el tiempo de retención hidráulico, la temperatura, el pH y la relación inóculo-sustrato. Todos estos parámetros se deben controlar ya que, como se presenta a continuación, afectan directamente a la eficiencia del proceso y, por ende, a la producción de biogás.

#### A) Relación C/N

La relación C/N es un indicador de los nutrientes disponibles en el sustrato. Los microorganismos anaerobios son capaces de consumir C entre 25 y 30 veces más rápido que el N [275]. Mientras que el C lo utilizan como fuente de energía, el N es esencial para la síntesis de proteínas y la construcción de estructuras celulares [272].

Valores apropiados de la relación C/N se encuentran entre 20:1 y 30:1, siendo el óptimo 25:1. Cuando esta relación se encuentra por debajo de 20:1 indica un exceso de N lo que provoca la acumulación de  $\text{NH}_4^+$  y un aumento del nitrógeno amoniacal total (NAT) y del pH del digestor. Estas condiciones pueden ser letales para las bacterias metanogénicas, además de favorecer la acumulación de AGV. Por el contrario, una relación C/N por encima de 35:1 indica una deficiencia de N, lo que

hace que se agote antes que el C. Como resultado, el C no podrá ser metabolizado completamente, ralentizando la producción de biogás [271,272].

### B) Tasa de carga orgánica

Este concepto se define como la cantidad de carga orgánica, expresada en sólidos volátiles (SV), que se introduce en el digestor por unidad de volumen. Es un parámetro crítico a la hora de mantener un equilibrio entre las etapas de acidogénesis y metanogénesis. Durante la acidogénesis, se generan AGV, que posteriormente son empleados en la etapa de metanogénesis. Sin embargo, un desequilibrio entre ambas etapas puede provocar una acumulación excesiva de AGV, lo que resulta en un descenso del pH del digestor y afecta negativamente al metabolismo de las bacterias metanogénicas.

Para optimizar el proceso, la carga orgánica diaria óptima recomendada se encuentra entre 1,6 y 4,8 kg SV/m<sup>3</sup>·d [271,272].

### C) Tiempo de retención hidráulico (TRH)

El tiempo de retención hidráulico (TRH) se corresponde con el tiempo medio que el sustrato permanece dentro del digestor. Es necesario que el sustrato esté en el digestor el tiempo suficiente para garantizar la máxima conversión de la materia orgánica en biogás [273]. Dado que la actividad metabólica y el crecimiento de los microorganismos anaerobios suelen ser procesos lentos, se recomienda que el TRH sea al menos el doble del tiempo de crecimiento de los microorganismos metanogénicos más lentos [272].

El TRH óptimo suele encontrarse entre 20 y 50 días para plantas piloto o comerciales de DA y entre 15 y 30 días para experimentos a escala de laboratorio [271].

### D) Temperatura

La temperatura es el factor que más influencia tiene en el proceso de DA, ya que los microorganismos metanogénicos son muy sensibles a las variaciones térmicas. En general, la DA puede operar en tres rangos de temperatura: psicrófilo (10-20°C), mesófilo (30-40°C) y termófilo (50-60°C), siendo estos dos últimos los más empleados [272]. Los procesos termófilos, pese a su mayor rendimiento en la generación de biogás, tienden a ser más inestables y costosos, debido a sus mayores requerimientos energéticos. Sin embargo, los sistemas mesófilos, aunque producen menor volumen de biogás, son más estables y energéticamente eficientes [273].

### E) pH

El pH es otro factor crítico en la DA, ya que afecta directamente también en el crecimiento y metabolismo de los microorganismos metanogénicos. Aunque cada grupo de microorganismos posee un rango óptimo de pH, el intervalo recomendado para la DA se encuentra entre 6,6 y el 7,4, siendo el óptimo entre 7,0 y 7,2 [271].

Valores de pH por debajo de 6,6 favorece la acumulación de ácido acético e  $H_2$ , lo que puede inhibir el proceso de DA y provoca acumulación excesiva de AGV. Por el contrario, cuando el pH se encuentra por encima de 7,5 se favorece la conversión de  $NH_4^+$  en amoníaco, inhibiendo el crecimiento bacteriano [275].

#### F) Relación inóculo: sustrato

La relación inóculo:sustrato es otro factor clave en la producción de metano cuando se utiliza biomasa de microalgas como sustrato en la DA, obteniéndose la mayor producción acumulada de metano con una relación 2:1 en base a los SV [285].

##### 1.4.1.1. Estrategias de mejora de la producción de biogás – Pretratamiento

Como se ha comentado previamente, la producción de biogás está directamente relacionada con el contenido en carbohidratos, lípidos y proteínas de las microalgas, que a su vez depende de la especie cultivada y de las condiciones de cultivo. Sin embargo, la complejidad de la pared celular de la biomasa de microalgas hace que tenga una baja biodegradabilidad anaerobia. Por este motivo, aplicar un pretratamiento previo a la DA, que facilite la disrupción celular, mejora la producción de metano a partir de microalgas [275].

Los componentes principales de la pared celular de las microalgas son celulosa y pectina, que la confieren una estructura rígida y resistente a las bacterias hidrolíticas. Además, en las microalgas verdes aparecen también biopolímeros alifáticos (algaenan) y en las microalgas marrones los polifenoles, que causan la inhibición de la actividad de las enzimas alginato liasas, dificultando su digestión [271]. En la Figura 1 - 33 se muestran las estructuras de la pared celular de las 10 especies de microalgas más importantes.

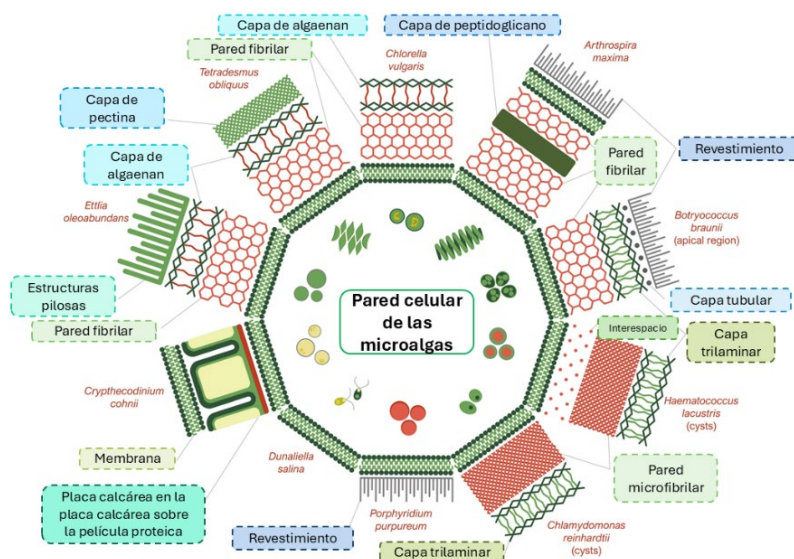


Figura 1 - 33. Estructura de la pared celular de diferentes microalgas. Adaptación de Carvalho et al. (2020) [286].

Los pretratamientos que pueden aplicarse a la biomasa de microalgas se pueden clasificar como: mecánicos, térmicos, hidrotérmico, biológicos y químicos.

#### A) Pretratamiento mecánico

Los pretratamientos mecánicos incluyen los métodos físicos destinados a reducir el tamaño celular (molienda) o la romper la pared celular (ultrasonido y microondas). En el caso del ultrasonido, la cavitación generada por ondas sonoras provoca la ruptura de la pared celular de dentro hacia afuera. Sin embargo, este método no puede romper enlaces químicos. Por otro lado, las microondas sí que son capaces de romper enlaces de hidrógeno, lo que altera la estructura de macromoléculas y debilita la pared celular [287].

En general, un mayor tiempo de exposición y una mayor potencia en los pretratamientos de ultrasonido y microondas favorece una mayor solubilización de la biomasa y, en consecuencia, una mayor producción de metano [287]. No obstante, una de las principales desventajas de estos métodos es su elevado consumo de energía [288].

En cuanto a la eficacia de los pretratamientos mecánicos, Dębowski et al. (2023) obtuvieron una producción de biogás entre 472 y 587 mL/gSV con *Scenedesmus* sp. tras aplicar diferentes tiempos de un pretratamiento con ultrasonido, en comparación con los 371 mL/gSV obtenidos con biomasa sin pretratar [289]. Además, al aplicar un pretratamiento de microondas a biomasa de un consorcio de microalgas (*Chlorella* y *Scenedesmus* como especies dominantes) y bacterias, la producción de biogás aumentó de 172,5 mL/gSV a un rango de 194,1-307,1 mL/gSV, en función de la cantidad de energía aplicada [290].

#### B) Pretratamiento térmico

Los pretratamientos térmicos consisten en someter la biomasa a temperaturas de hasta 100°C, con el objetivo de debilitar la pared celular de las microalgas de forma eficiente y con menor consumo de energía [287,291]. De hecho, este pretratamiento se considera uno de los más efectivos para mejorar la digestión anaerobia [288].

La temperatura y el tiempo de exposición son factores que afectan a la solubilización de la biomasa, siendo la temperatura el parámetro más determinante. Para incrementar la producción de biogás, se recomienda que el rango de temperatura del pretratamiento térmico esté entre 55 y 170°C. Sin embargo, aunque las altas temperaturas favorecen la solubilización e hidrólisis de macromoléculas, también pueden generar compuestos inhibitorios que afectan al metabolismo de los microorganismos anaerobios [287].

En un estudio realizado por Wang et al. (2017) con biomasa de *Chlorella* sp., obtuvieron una producción de metano de 155 mL/gSV con la biomasa sin pretratar y

al someterla a un pretratamiento térmico a 70°C, 90°C y 120°C, consiguieron un aumento del 38%, 47% y 108% en la producción de metano, respectivamente [292].

### C) Pretratamiento hidrotérmico

El tratamiento hidrotérmico puede considerarse un pretratamiento térmico avanzado, en el cual, además de aplicar calor a la biomasa, se combina con presión [293]. En este pretratamiento, se emplean temperaturas superiores a 100°C, y la presión acumulada se libera gradualmente al finalizar el proceso. Gracias a estas condiciones, se ve reducido el tiempo del proceso en comparación con otros tratamientos a temperaturas más bajas [294]. El pretratamiento hidrotérmico es particularmente eficaz para romper estructuras lignocelulósicas, permitiendo la eliminación de una mayor proporción de hemicelulosa y una parte de lignina, lo que facilita su descomposición en una fracción soluble [291].

Diversos estudios han comprobado la eficacia de este método. Passos et al. (2015) observaron que, al aplicar un tratamiento hidrotérmico a un consorcio de microalgas y bacterias, se obtenía un 28% más de metano en comparación con los 106 mL/gSV del control sin pretratar [295]. Además, Dar et al. (2020) lograron una mejora significativa al aplicar un pretratamiento hidrotérmico a *Spirulina subsalsa*, obteniendo una producción de 23,77 L/kgSV de biogás total con la biomasa sin pretratar, mientras que la biomasa pretratada alcanzó 33,30 L/kgSV [296].

### D) Pretratamiento biológico

Los pretratamientos biológicos se basan en la hidrólisis de la pared celular de las microalgas mediante la acción de enzimas específicas comerciales o de microorganismos que las producen in situ. Entre las enzimas más empleadas en este proceso se encuentran celulasas, lipasas o esterasas. Este tipo de pretratamiento presenta algunas ventajas, como un menor consumo energético, una alta selectividad de las reacciones enzimáticas y que no se producen productos inhibitorios [293].

Sin embargo, los métodos biológicos requieren un buen control del proceso, ya que son altamente sensibles a los cambios. Por ejemplo, un pH inadecuado o temperaturas elevadas pueden desactivar las enzimas y provocar la desnaturalización de las proteínas [288]. Además, este tipo de pretratamientos presentan otras desventajas, como altos costos de las enzimas comerciales, una duración prolongada del proceso y dificultades para determinar la cantidad óptima de microorganismos o enzimas necesarios para lograr una hidrólisis completa [287,293].

Estudios previos han demostrado que el pretratamiento biológico puede mejorar la producción de metano. Por ejemplo, Kendir Çakmak et al. (2020) evaluaron el impacto del pretratamiento enzimático en la digestión anaerobia de *Porphyridium cruentum* en condiciones mesófilas, obteniendo una producción de metano sin pretratamiento de 130 mL/gSV. Al emplear proteasa, consiguieron mejoras del 29% al

77%, dependiendo de la dosis utilizada, mientras que con viscozyme encontraron incrementos del 22% al 32% de la producción de metano [297].

### E) Pretratamiento químico

El pretratamiento químico consiste en la adición de compuestos alcalinos, ácidos, oxidantes o disolventes orgánicos a la biomasa con el objetivo de solubilizar los polímeros de la pared y mejorar la biodegradación. Dentro de esta categoría, el pretratamiento alcalino suele realizarse con hidróxido de calcio, potasio o sodio, trabajando en rangos de pH elevados entre 9 y 12. Por otro lado, el pretratamiento ácido emplea comúnmente ácido sulfúrico o clorhídrico a pH bajos. Finalmente, entre los agentes oxidantes más usados para debilitar la pared celular se encuentran el ozono y el peróxido de hidrógeno.

Los principales factores que influyen en estos procesos incluyen la concentración de los químicos utilizados, la concentración de biomasa, la temperatura y el tiempo de exposición. Entre las ventajas del pretratamiento químico destaca su elevado grado de solubilización de la biomasa y su baja demanda energética en comparación con los pretratamientos térmicos y mecánicos. Sin embargo, presenta también algunas desventajas, como el coste de los reactivos químicos, el desequilibrio del pH del medio, la posible inhibición de los microorganismos metanogénicos debido a la liberación de iones y moléculas tóxicas durante el pretratamiento y la corrosión de los reactores [287,293].

Existen evidencias previas de la eficacia del pretratamiento químico a la hora de mejorar la producción de metano. Por ejemplo, al aplicar un pretratamiento alcalino a una mezcla de *Chlorella* sp. y *Scenedesmus* sp. con un pH de 9, se logró incrementar la producción de metano a 363 mL/gSV, en comparación con los 336 mL/gSV obtenidos con la biomasa sin tratar [298].

## 1.4.2. Biorrefinerías propuestas

Como se ha comentado previamente, la presente tesis se enmarca en la integración de un sistema de tratamiento de aguas residuales basado en microalgas para la eliminación simultánea de nutrientes y CDEs, con el posterior aprovechamiento de la biomasa para la producción de biogás. Para ello, se estudiarán dos configuraciones dentro del esquema una EDAR convencional, en la primera se integrará el sistema con microalgas como tratamiento secundario (biológico) y en la segunda como tratamiento terciario.

En primer lugar, se seleccionaron dos especies de microalgas con las que se trabajaría: *Scenedesmus* sp. y *C. vulgaris*. La elección de estas especies se fundamentó en que los géneros *Chlorella* y *Scenedesmus* son los más reportados en literatura para la eliminación de CDEs [220,256,299–302]. Adicionalmente, presentan

la ventaja de encontrarse de forma natural en las EDAR, siendo incluso posible aislarlas directamente de estos sistemas [303–305].

Además, con el objetivo de maximizar la obtención de biogás, se evaluó también la incorporación de un pretratamiento de hidrólisis térmica (hidrotermal) previo a la digestión anaerobia de la biomasa. Para seleccionar este pretratamiento, se descartaron previamente otras alternativas debido a diferentes limitaciones. En primer lugar, los pretratamientos mecánicos requieren un elevado consumo energético; por ejemplo, para obtener una producción similar de biogás con *S. obliquus* mediante ultrasonido se necesitaría aproximadamente diez veces más de energía que utilizando un tratamiento hidrotermal [306]. Por otro lado, aunque los pretratamientos químicos demandan menor energía, presentan importantes inconvenientes como la generación de compuestos tóxicos capaces de inhibir la actividad metanogénica, así como los elevados costes de los reactivos químicos necesarios [293]. Al comparar los tratamientos térmicos e hidrotermales en igualdad de temperatura y condiciones operativas, en general se observan mejores resultados en la producción de biogás mediante tratamientos hidrotermales [306]. Finalmente, aunque los tratamientos enzimáticos han demostrado alta efectividad, el elevado coste asociado a la producción y purificación de enzimas comerciales limita su aplicación a escala industrial [307].

Además de las ventajas mencionadas, existen EDAR que tienen implementadas tecnologías de hidrólisis térmica, avalando su potencial para mejorar la producción de biogás. Ejemplos destacados en España son las EDAR de Copero y La Ranilla, ambas situadas en Sevilla [308,309].

La implementación de ambas configuraciones en una EDAR real se representa en los esquemas de la Figura 1 - 34. En la primera configuración (Figura 1 - 34(a)), se evaluó la capacidad del sistema de microalgas como reactor biológico para eliminar nutrientes y una mezcla de CDEs de un agua residual sintética (ARS), preparada de acuerdo con la composición típica del efluente tras el tratamiento primario. En la segunda biorrefinería (Figura 1 - 34(b)), el fotobiorreactor se empleó como tratamiento terciario para evaluar asimismo la eliminación de nutrientes y CDEs en agua residual real, obtenida de la salida de la decantación secundaria.

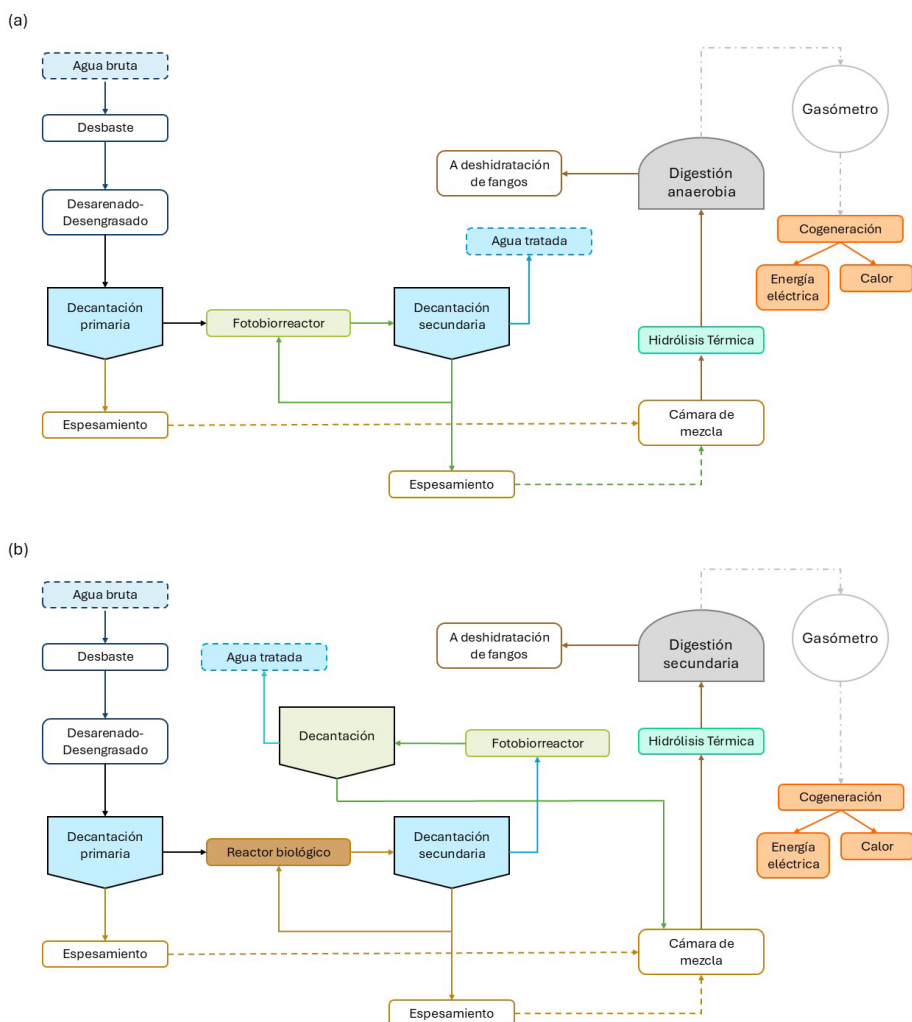


Figura 1 - 34. Biorrefinerías propuestas:(a) fotobiorreactor de microalgas como tratamiento secundario (biológico) y (b) fotobiorreactor de microalgas como tratamiento terciario.

**02**

**OBJETIVOS**



## 2. Objetivos

El objetivo principal de la presente tesis doctoral es el estudio de un sistema basado en microalgas para la eliminación conjunta de nutrientes y CDEs presentes en aguas residuales, incluyendo la posterior revalorización de la biomasa algal mediante la obtención de biogás. Particularmente, se evaluará la viabilidad de dicho sistema para emplearlo como tratamiento secundario (biológico) o terciario en el esquema de una estación depuradora de aguas residuales (EDAR). Para ello, este trabajo se ha dividido en cuatro capítulos, cada uno con sus objetivos específicos.

### 1. Desarrollo de un método analítico para la detección y cuantificación de CDEs

El objetivo de este capítulo es desarrollar y validar un método analítico eficiente para la detección y cuantificación de la mezcla de CDEs seleccionada. Los objetivos específicos son los siguientes:

- Desarrollar un método de detección y cuantificación de los CDEs mediante HPLC-DAD.
- Validar el método mediante la evaluación de diferentes parámetros: factor de asimetría, resolución de picos, número de platos teóricos, factor de retención, linealidad, precisión y límites de cuantificación y detección.
- Analizar el efecto de las variables en la recuperación de los CDEs: volumen de muestra, volumen de eluyente, pH y masa de adsorbente.
- Determinar los valores más adecuados de dichas variables en función del estudio y de las limitaciones experimentales.
- Evaluar la idoneidad de los valores seleccionados mediante la estimación de la recuperación, el punto de ruptura del cartucho, la reproducibilidad y ensayos con muestras reales.

### 2. Evaluación del uso de microalgas como tratamiento secundario (biológico) de una EDAR.

Este capítulo tiene como objetivo evaluar la capacidad de las microalgas como tratamiento biológico de una EDAR para eliminar nutrientes y CDEs en aguas residuales domésticas. Los objetivos específicos son los siguientes:

- Evaluar y comparar el crecimiento de *Scenedesmus* sp. y *C. vulgaris* durante 7 días en agua residual sintética (ARS) en presencia y ausencia de CDEs.
- Estudiar el efecto de la presencia de CDEs en el medio sobre la composición bioquímica y elemental de ambas especies.

- Analizar la eliminación de nutrientes en ambas especies en presencia y ausencia de CDEs.
- Evaluar la eliminación de CDEs por la presencia de microalgas y compararla con la degradación por factores abióticos (luz, oxígeno y su combinación).
- Elaborar balances de masa de los CDEs para determinar su mecanismo de eliminación principal en cada especie.

### 3. Digestión anaerobia como vía de revalorización de biomasa algal

El objetivo de este capítulo es estudiar la viabilidad de la digestión anaerobia (DA) para producir biogás a partir de biomasa algal obtenida tras el tratamiento de aguas residuales. Los objetivos específicos son los siguientes:

- Determinar la viabilidad de la DA para la producción de biogás a partir de la biomasa de *Scenedesmus* sp. y *C. vulgaris* tras el tratamiento de aguas residuales.
- Aplicar un pretratamiento de hidrólisis térmica y evaluar su efecto en la producción de biogás, comparándolo con los resultados obtenidos con la biomasa sin pretratar.

### 4. Evaluación del sistema de microalgas como tratamiento terciario

Este capítulo tiene como objetivo analizar la viabilidad del sistema basado en microalgas como tratamiento terciario para la eliminación de nutrientes y CDEs en aguas residuales reales. Los objetivos específicos son los siguientes:

- Seleccionar la especie más idónea entre *Scenedesmus* sp. y *C. vulgaris* para crecer en agua residual real.
- Estudiar el crecimiento de *Scenedesmus* sp. en agua residual real en ausencia y presencia de CDEs durante 7 días.
- Analizar el efecto de la presencia de CDEs en la eliminación de nutrientes por *Scenedesmus* sp.
- Evaluar la eliminación de CDEs en presencia de *Scenedesmus* sp. y compararla con su degradación en condiciones abióticas.

**03**

**METODOLOGÍA**



### 3. Metodología

En este apartado se describen los materiales empleados en la presente tesis doctoral. En primer lugar, se presenta la metodología de cultivo del inóculo, el cual sirvió como madre para los experimentos posteriores. A continuación, el capítulo se divide en cuatro bloques, cada uno correspondiente con la metodología específica de los procesos desarrollados en los distintos apartados de resultados, junto con las instalaciones experimentales asociadas a cada uno de ellos.

#### 3.1. Cultivo de microalgas

Los inóculos de microalgas de *Scenedesmus* sp. y *C. vulgaris* fueron adquiridos en el Banco Español de Algas (Las Palmas de Gran Canaria, España) y cultivados en medio comercial BG11 Broth (Sigma Aldrich. St. Louis, MO, EE.UU.), complementado con una disolución de metales traza (Sigma Aldrich). El pH del medio se ajustó a 7,4 mediante la adición de una disolución de NaOH 0,5 M.

El cultivo se realizó en botellas ISO de 2 L, utilizadas como fotobiorreactores, selladas con tapones septum de goma que permitían la inserción de un tubo de plástico para la aireación (Figura 3 - 1). El sistema de aireación, encargado del suministro de CO<sub>2</sub>, estaba compuesto por bombas de aire que aportaban un caudal de 3,5 L/min a cada cultivo. El aire era previamente filtrado mediante un filtro de membrana de nylon de 0,45 µm (Agilent Technologies. Santa Clara, CA, EE.UU.) antes de entrar en contacto con los cultivos.

La iluminación se proporcionó mediante un sistema de tiras LED de 12 V, que aportaban una irradiación de 108 µmol·fotón·m<sup>-2</sup>·s<sup>-1</sup>. El fotoperiodo se reguló mediante un temporizador programado, estableciendo 12 horas de luz y 12 horas de oscuridad, de acuerdo con [310,311].

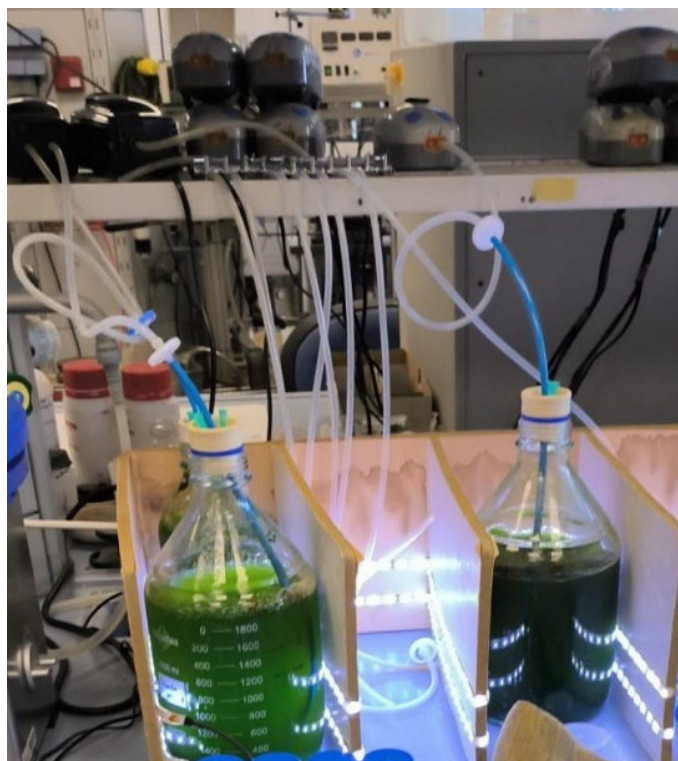


Figura 3 - 1. Instalaciones de cultivo.

## 3.2. Método analítico para la detección de CDEs en aguas residuales

### 3.2.1. Materiales

- Metilparabeno (MeP) (Sigma-Aldrich. St. Louis, MO, EE.UU.)
- Propilparabeno (PrP) (Sigma-Aldrich)
- Butilparabeno (BuP) (Sigma-Aldrich)
- Benzofenona (BP) (Sigma-Aldrich)
- Bisfenol A (BPA) (Sigma-Aldrich)
- Estrona (E) (Sigma-Aldrich)
- Metanol grado LC-MS (Scharlau. Barcelona, España)
- Acetonitrilo grado HPLC (Scharlau)
- Sistema Autwomatic plus 1+2 (Wasserlab. Barbatáin, España) para obtener agua milli-Q y destilada
- NaCl, CaCl<sub>2</sub>, MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> y NH<sub>4</sub>Cl (Sigma-Aldrich)
- Cartuchos Extrapond C18 de 500 mg y 6 mL (Scharlau)
- Cartuchos ExtraBond C18 de 50 mg y 1 mL (Scharlau)
- El agua residual de la salida de la decantación secundaria se recoge en una EDAR urbana

En la Tabla 3 - 1 se presentan las propiedades fisicoquímicas de los CDEs seleccionados para el estudio. Además, se preparó una disolución stock de 1000 mg/L de cada contaminante en metanol, la cual se almacenó a 4°C en nevera.

Tabla 3 - 1. Propiedades fisicoquímicas de los compuestos

| Compuesto                                                    | MeP                                          | PrP                                            | BuP                                            |
|--------------------------------------------------------------|----------------------------------------------|------------------------------------------------|------------------------------------------------|
| Fórmula química                                              | C <sub>8</sub> H <sub>8</sub> O <sub>3</sub> | C <sub>10</sub> H <sub>12</sub> O <sub>3</sub> | C <sub>11</sub> H <sub>14</sub> O <sub>3</sub> |
| Peso molecular (g/mol)                                       | 152,15                                       | 180,20                                         | 194,23                                         |
| Solubilidad en agua (g/L)                                    | 2,50[312]                                    | 0,40 [313]                                     | 0,21 [314]                                     |
| Temperatura de fusión (°C)                                   | 125 [312]                                    | 96-98 [313]                                    | 69 [314]                                       |
| Temperatura de ebullición (°C)                               | 270-280 [312]                                | 295 [315]                                      | 369 [314]                                      |
| Coeficiente de partición octanol-agua (log K <sub>OW</sub> ) | 1,66 [316]                                   | 2,34-3,04 [317]                                | 3,57 [314]                                     |
| Compuesto                                                    | BP                                           | BPA                                            | E                                              |
| Fórmula química                                              | C <sub>13</sub> H <sub>10</sub> O            | C <sub>15</sub> H <sub>16</sub> O <sub>2</sub> | C <sub>18</sub> H <sub>22</sub> O <sub>2</sub> |
| Peso molecular (g/mol)                                       | 182,22                                       | 228,29                                         | 270,37                                         |
| Solubilidad en agua (g/L)                                    | 0,14 [318]                                   | 0,12 [319]                                     | 0,03 [320]                                     |
| Temperatura de fusión (°C)                                   | 48 [318]                                     | 160 [319]                                      | 260 [320]                                      |
| Temperatura de ebullición (°C)                               | 305 [318]                                    | 361 [319]                                      | 445 [320]                                      |
| Coeficiente de partición octanol-agua (log K <sub>OW</sub> ) | 3,18 [321]                                   | 2,20-3,80 [322]                                | 3,30 [323]                                     |

### 3.2.2. HPLC-DAD

El desarrollo detallado de los métodos cromatográficos empleados para analizar todas las muestras se encuentra en la sección 4.1.1 del capítulo 4.1 de resultados. A continuación, se presenta un resumen de los parámetros más relevantes.

Para determinar la concentración de CDEs en las muestras, se empleó un HPLC (Agilent Technologies. Santa Clara, CA, EE.UU.) equipado con un detector DAD (modelo 1260 DAD WR, Agilent Technologies) y una columna Ascentis Express C18 (100 mm x 4,6 mm, 5 µm, Supelco, Merck. Darmstadt, Alemania). Con el objetivo de lograr una adecuada separación e identificación de todos los compuestos, se desarrollaron dos métodos cromatográficos.

El método 1 se empleó para los compuestos PrP, BuP, BP, BPA y E. La fase móvil consistió en una mezcla de acetonitrilo (ACN) grado HPLC con un 0,1% de ácido fórmico y agua, en proporción 45:55, con un caudal de 0,5 mL/min y una duración total del análisis de 12 min. Las longitudes de onda seleccionadas fueron 254 nm para los parabenos y BP, y 210 nm para el BPA y E. La temperatura de la columna se mantuvo a 35°C.

Por otro lado, el método 2 fue desarrollado exclusivamente para el MeP, debido a su escasa retención en la columna con el método anterior. Este método se basó en un gradiente de elución que comenzaba con una proporción 30:70 de ACN:agua, aumentando progresivamente a 60:40 a los 4 minutos, descendiendo nuevamente a 30:70 a los 7 min y estabilizándose durante 3 min adicionales. La detección se realizó a 254 nm, con un caudal de fase móvil de 1,0 mL/min y una temperatura de columna de 20°C.

Ambos métodos fueron evaluados mediante parámetros típicos: factor de asimetría ( $A_s$ ), resolución de picos ( $R_s$ ), número teórico de platos ( $N$ ) y factor de retención o de capacidad ( $k'$ ).

- **Factor de asimetría ( $A_s$ ):** se obtuvo directamente mediante el software del equipo.
- **Resolución de picos ( $R_s$ ):** calculada con la ecuación ( 4 ) [324].

$$(4) R_s = \frac{2 \cdot (t_{R2} - t_{R1})}{W_2 - W_1}$$

Donde  $t_{R1}$  y  $t_{R2}$  son los tiempos de retención de dos picos contiguos y  $W_1$  y  $W_2$  sus respectivos anchos.

- **Número teórico de platos ( $N$ ):** calculado según la ecuación ( 5 ) [325].

$$(5) N = 16 \cdot \left( \frac{t_R}{W} \right)^2$$

Donde  $t_R$  es el tiempo de retención de un compuesto y  $W$  su ancho de pico.

- **Factor de retención ( $k'$ ):** determinado mediante la ecuación ( 6 ) [324].

$$(6) k' = \frac{t_R - t_0}{t_0}$$

Donde  $t_R$  es el tiempo de retención del analito y  $t_0$  el tiempo muerto de la columna.

Asimismo, ambos métodos fueron validados mediante el estudio de su linealidad, precisión y límites de cuantificación (LOQ) y detección (LOD). Para evaluar la linealidad, se partió de la disolución stock de 1000 ppm de cada CDEs, la cual fue diluida en metanol hasta una concentración de 15 ppm. A partir de esta se prepararon disoluciones de 12, 9, 6,3, 3,3 y 0,375 ppm, y todas fueron analizadas según los métodos desarrollados por triplicado. Para el estudio de la precisión, se prepararon tres diluciones adicionales a partir de la disolución de 15 ppm, alcanzando una concentración final de 10, 7 y 2 ppm. Estas tres disoluciones fueron analizadas también de acuerdo con los métodos desarrollados.

Finalmente, para determinar el LOQ y LOD, se empleó el método de señal-ruido (S/N), considerando una relación S/N de 3 para el LOD y de 10 para el LOQ [326]. Se partió de una disolución de 200 ppb de todos los CDEs, que fue diluida

progresivamente y cuantificada mediante HPLC. La concentración más baja que pudo integrarse mediante el software del equipo se consideró el límite de cuantificación instrumental (ILOQ). Las concentraciones inferiores a este valor fueron estimadas en función de la altura de pico. El ruido se definió como la diferencia entre la intensidad máxima y mínima registrada alrededor del tiempo de retención del analito. La altura de pico se midió desde el máximo del mismo hasta la línea base. El proceso se repitió hasta alcanzar las relaciones S/N indicadas para el LOQ y LOD.

### 3.2.3. Método de extracción en fase sólida (SPE)

Para garantizar una preparación adecuada de todas las muestras previas al análisis por HPLC, se estableció un método de SPE, cuyo desarrollo completo se describe en la sección 4.1.2 del capítulo 4.1 de Resultados. Aquí se recogen los aspectos más importantes del método.

Inicialmente, se llevó a cabo un estudio de variables con el objetivo de evaluar el efecto del volumen de muestra, volumen de eluyente, pH y masa de adsorbente sobre la recuperación de cada uno de los CDEs. La recuperación se calculó empleando la ecuación (7).

$$(7) \text{ Recuperación (\%)} = \frac{C_{\text{Real}}}{C_{\text{Teórica}}} \cdot 100$$

Donde  $C_{\text{Real}}$  es la concentración medida del contaminante tras la extracción (ppm) y  $C_{\text{Teórica}}$  la concentración añadida inicialmente a la muestra (ppm).

En este estudio se evaluaron dos niveles para cada variable: volumen de muestra de 10 mL y de 100 mL, volumen de eluyente de 0,5 mL y de 10 mL, pH de 2 y de 7 y masa de adsorbente de 50 mg y de 500 mg. Con todas las combinaciones posibles se realizaron un total de 16 experimentos, a los que se sumaron 12 experimentos adicionales para estudiar niveles intermedios de volumen de muestra, volumen de elución y pH.

Las muestras se prepararon en agua residual sintética (ARS), de acuerdo con la composición típica del efluente de la decantación primaria de una EDAR urbana [327]: 7 mg NaCl, 4 mg CaCl<sub>2</sub>, 2 mg MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O, 15 mg KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> y 115,6 mg NH<sub>4</sub>Cl por litro de agua. Posteriormente, se doparon con la cantidad necesaria de disolución stock para alcanzar una concentración final de 1 ppm de cada contaminante.

A partir del análisis de resultados y considerando las limitaciones experimentales existentes (como la necesidad de un factor de concentración elevado, definido en la ecuación (8)), se establecieron las condiciones del método que proporcionaban, en general, buenas recuperaciones para todos los CDEs: 30 mL de volumen de muestra, 2 mL de volumen de eluyente, pH de 7 y una masa de adsorbente de 500 mg.

$$(8) FC = \frac{V_{\text{muestra}}}{V_{\text{eluyente}}}$$

Siendo  $V_{\text{muestra}}$  el volumen de muestra tratado (mL) y  $V_{\text{eluyente}}$  el volumen de elución utilizado (mL).

Adicionalmente, se llevaron a cabo pruebas para evaporar el disolvente de elución y resuspender los contaminantes en un rotavapor modelo HB eco (IKA. Staufen, Alemania) y en un evaporador Reacti-Therm (Thermo Fisher Scientific. Waltham, MA, EE.UU.)

El proceso de extracción se llevó a cabo empleando un sistema de SPE Visiprep 24 (Supelco. Bellefonte, PA, USA) y cartuchos C18 de 500 mg o de 50 mg. Los cartuchos fueron preacondicionados con metanol y agua. Posteriormente, se cargaba el volumen de muestra, ajustada al pH deseado, a través del cartucho, permitiendo su paso por gravedad. El sobrenadante de la muestra, tras su paso por el cartucho, fue descartado. Finalmente, los analitos retenidos en el adsorbente se eluyeron con 2 mL de metanol grado LC-MS, recolectándose en tubos de ensayo, tal como se muestra la Figura 3 - 2. El volumen recolectado fue directamente utilizado para el análisis en el sistema HPLC-DAD.



Figura 3 - 2. Sistema de SPE.

#### 3.2.4. Análisis estadístico

Los experimentos para evaluar la evaporación del disolvente, tanto en un rotavapor como en un evaporador con nitrógeno, la recuperación de los contaminantes, la linealidad y la reproducibilidad del método de SPE y el punto de

ruptura de los cartuchos se realizaron por triplicado, al igual que las pruebas con muestras reales.

Para analizar las posibles diferencias entre las recuperaciones dentro del rango de trabajo de 1 ppm a 25 ppb, se aplicó un análisis de varianza (ANOVA).

### 3.3. Experimentos del sistema basado en microalgas como tratamiento biológico

#### 3.3.1. *Materiales*

- NaCl, CaCl<sub>2</sub>, MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> y NH<sub>4</sub>Cl (Sigma-Aldrich. St. Louis, MO, EE.UU.)
- Metilparabeno (MeP) (Sigma-Aldrich)
- Propilparabeno (PrP) (Sigma-Aldrich)
- Butilparabeno (BuP) (Sigma-Aldrich)
- Benzofenona (BP) (Sigma-Aldrich)
- Bisfenol A (BPA) (Sigma-Aldrich)
- Estrona (E) (Sigma-Aldrich)
- Azida de sodio (Sigma-Aldrich)
- Metanol grado LC-MS (Scharlau. Barcelona, España)
- Sistema Autwomatic plus 1+2 (Wasserlab. Barbatáin, España) para obtener agua milli-Q y destilada
- Cloroformo (Scharlau)
- Ácido sulfúrico al 98% (Scharlau)
- Fenol (Sigma Aldrich)
- D-glucosa (Scharlau)
- Seroalbúmina bovina (BSA) (Acros Organics. Geel, Bélgica)
- Reactivo Folin (Sigma Aldrich).
- Kits de nitrógeno amoniacal, fosfatos y test en cubetas de DQO soluble (Merck. Darmstadt, Alemania)
- Disoluciones patrón de amonio, fosfatos y DQO (Merck)

#### 3.3.2. *Instalación experimental*

La degradación de los CDEs se evaluó en presencia de microalgas, luz y aireación (LOM). Por otro lado, la eliminación abiótica de los CDEs se estudió mediante experimentos control, en los que se analizaron los efectos individuales de la luz (L), la aireación (O) y su combinación (LO).

Todos los experimentos se realizaron en reactores en discontinuo de vidrio de 50 mL, seleccionados específicamente para evitar la adsorción de CDEs en las paredes, como ocurre con los materiales plásticos. El volumen de trabajo fue de 48 mL, y los reactores se mantuvieron en las condiciones experimentales durante 7 días.

### 3.3.2.1. Experimentos LOM

En los experimentos LOM, los reactores se llenaron con ARS e inóculo de microalgas, ajustando una densidad algal inicial de 0,1 g/L. Cada reactor fue dopado con 1 ppm de cada CDEs, utilizando para ello una disolución intermedia de 10 ppm en ARS preparada a partir de la disolución stock. Además, se llevaron a cabo experimentos control sin contaminantes.

Los reactores fueron sellados con tapones de goma, en los que se insertó un tubo de acero inoxidable para permitir la aireación de los cultivos (Figura 3 - 3). Todos los experimentos se realizaron bajo condiciones de aireación, empleando bombas de aire y válvulas divisoras, que suministraban un caudal de 0,58 L/min a cada reactor. Antes de alcanzar los cultivos, el aire fue filtrado a través de un filtro de nylon de 0,45  $\mu\text{m}$  (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, EE.UU.).

Los reactores fueron irradiados mediante tiras LED de 12 V, proporcionando una irradiancia de 108  $\mu\text{mol}\cdot\text{fotón}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ . El fotoperiodo se estableció en 12 horas de luz, seguidas de 12 horas de oscuridad.



Figura 3 - 3. Instalación experimental de los experimentos LOM

### 3.3.2.2. Experimentos abióticos

Los reactores de los experimentos L, O y LO se rellenaron con ARS y fueron dopados con 1 ppm de la mezcla de CDEs. Los experimentos L y LO se llevaron a cabo bajo condiciones de irradiación, siguiendo con el procedimiento descrito para los

ensayos LOM. Por el contrario, los experimentos O se realizaron en condiciones de oscuridad, para lo cual los reactores fueron cubiertos con papel aluminio, evitando la exposición a la luz. Por otro lado, los experimentos O y LO se llevaron a cabo bajo las mismas condiciones de aireación establecidas para los ensayos LOM. Adicionalmente, a todos los ensayos abióticos se le añadió un 0,01%v/v de azida de sodio para evitar el desarrollo microbiano.

### 3.3.3. Procedimiento experimental

#### 3.3.3.1. Experimentos LOM

En la Figura 3 - 4 se presenta un esquema del procedimiento experimental diario seguido con los experimentos LOM. De los 48 mL de cultivo, se recogieron diariamente 12 mL, que se filtraron a través de un filtro de 0,45  $\mu\text{m}$  para la determinación del crecimiento de la biomasa por peso seco. El sobrenadante obtenido tras el filtrado se utilizó para el análisis del contenido en amonio, fosfatos y DQO soluble, y además se registró diariamente el pH del cultivo. Este procedimiento se llevó a cabo también con las muestras control (en ausencia de CDEs).

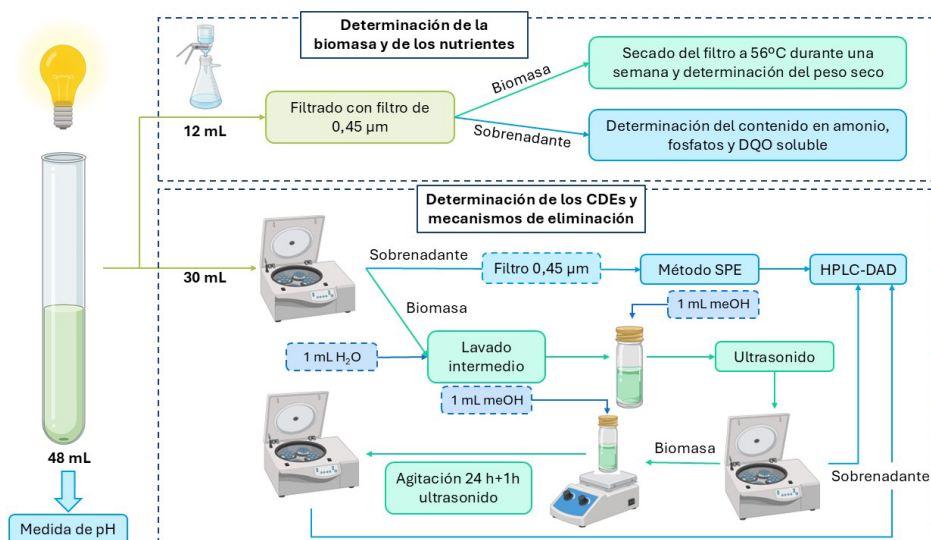


Figura 3 - 4. Resumen del procedimiento experimental seguido con los experimentos LOM para un sistema de tratamiento biológico. Iconos diseñados con Biorender.

Por otra parte, se tomaron 30 mL adicionales para evaluar la eliminación de CDEs en el sobrenadante a lo largo del tiempo. Esta fracción se centrifugó para separar el pellet de biomasa del sobrenadante. El sobrenadante se sometió al proceso de SPE previamente desarrollado y se analizó mediante HPLC-DAD para cuantificar la concentración remanente diaria de cada contaminante. La biomasa se lavó con 1 mL de agua milliQ, se centrifugó nuevamente y se descartó el agua de lavado. A continuación, se añadió 1 mL de metanol (MeOH) a la biomasa y la mezcla se sometió a ultrasonido durante 1 hora. Posteriormente, se centrifugó y se analizó el

sobrenadante mediante HPLC-DAD, con el fin de determinar la cantidad de CDEs adsorbidos sobre la pared celular de la microalga. Finalmente, la biomasa se resuspendió en 1 mL de meOH, se agitó toda la noche y se le aplicó ultrasonido nuevamente durante 1 hora para promover la ruptura de la pared celular. Esta mezcla se filtró y el sobrenadante se analizó por HPLC-DAD para estimar la cantidad de CDEs acumulados en el interior de la célula.

#### ❖ **Determinación de la biomasa y de los nutrientes:**

El crecimiento de la biomasa se midió diariamente. Para determinar el peso seco, se filtraron 12 mL del cultivo de microalgas a través de un filtro de membrana de nylon de 0,45  $\mu\text{m}$  (GVS, Bolonia, Italia) previamente pesado. Posteriormente, los filtros fueron secados durante una semana a 56°C en una estufa (JP Selecta. Barcelona, España). Una vez secos, se pesaron en una balanza y el peso seco se calculó como la diferencia entre el peso final y el inicial.

Además, el pH del cultivo también se midió diariamente empleando un pHmetro (XS Instruments. Módena, Italia).

La productividad de la biomasa (P) se estimó de acuerdo con la ecuación ( 9 ) [328]:

$$(9) \quad P = \frac{X_f - X_i}{t_f - t_i}$$

Donde  $X_f$  y  $X_i$  representan las concentraciones de biomasa (g biomasa seca/L) en los tiempos  $t_i$  (inicio, en horas) y  $t_f$  (final, en horas), respectivamente, y P la productividad de biomasa (g biomasa seca/L·h).

La biomasa recogida a los siete días fue liofilizada en un liofilizador modelo Lyomicron (Coolvacuum. Barcelona, España) y se analizó su contenido en lípidos, proteínas, carbohidratos y cenizas. Además, se estimó su composición elemental en H, C, N, S y O y el potencial Zeta de la superficie de la biomasa. Debido a la resistencia de la pared celular, antes de proceder a la caracterización bioquímica, la biomasa fue sometida a un proceso de ruptura celular mecánica utilizando un dispersor ULTRA TURRAX T25 (IKA. Staufen, Alemania). El procedimiento consistió en tres tandas de ruptura de 5 minutos cada una, a una velocidad de 20000 rpm. Para evitar el aumento de temperatura por fricción mecánica, el recipiente con la biomasa se colocó en un baño con hielo durante el proceso, como se muestra en la Figura 3 – 5.



Figura 3 – 5. Procedimiento de ruptura de la pared celular.

Para la determinación de lípidos se empleó el método de Bligh y Dyer [329], utilizando una mezcla metanol:cloroformo en una proporción 1:2 en volumen. Los lípidos fueron extraídos en la fase cloroformo (fase inferior en la Figura 3 – 6) y, tras el secado de la muestra, se cuantificaron gravimétricamente.

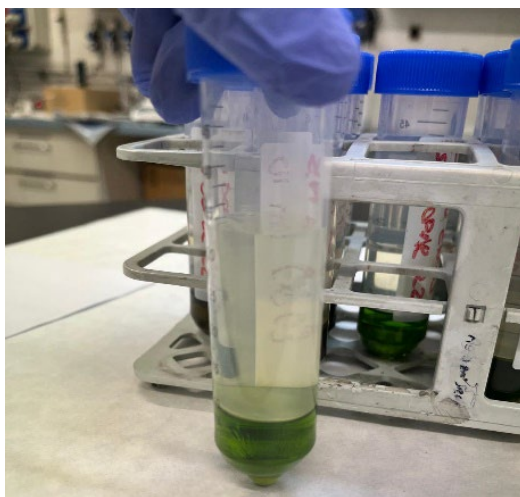
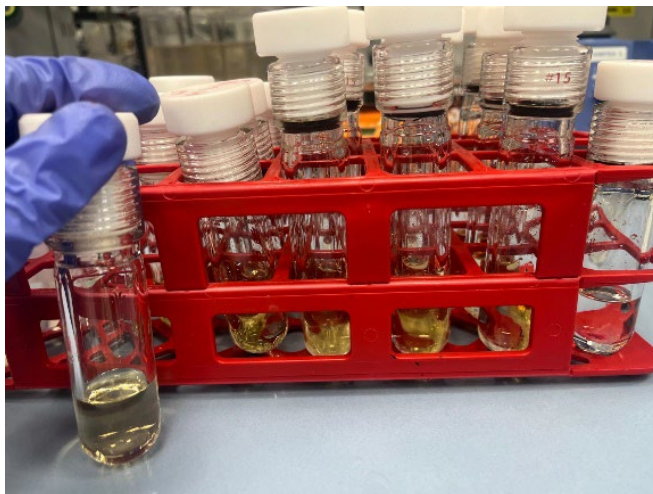


Figura 3 – 6. Determinación de lípidos.

Los carbohidratos se cuantificaron siguiendo el método de DuBois o fenol-sulfúrico [330]. Para la curva de calibrado, se empleó D-glucosa en agua Milli-Q en diferentes concentraciones. A la muestra se añadieron 1 mL de fenol al 5% m/v

disuelto en agua y 5 mL de ácido sulfúrico al 98%, seguido de un calentamiento a 90°C. Posteriormente, se dejó reposar 30 minutos a temperatura ambiente. Tras enfriarse, la absorbancia se midió en un espectrofotómetro modelo V-630 (Jasco. Tokio, Japón) a 487 nm. En la Figura 3 – 7 se presenta una imagen de las muestras una vez digeridas.



*Figura 3 – 7. Determinación de carbohidratos*

Las proteínas se midieron con el método de Lowry [331]. La curva de calibrado de proteínas totales se elaboró con BSA. A la muestra se le añadieron 950  $\mu$ L de reactivo Lowry, dejándola reposar 10 minutos. Posteriormente, se añadieron 100  $\mu$ L de reactivo Folin, esperando 30 minutos antes de medir la absorbancia en un espectrofotómetro Jasco V-630 (Tokio, Japón) a 759 nm (Figura 3 – 8).



*Figura 3 – 8. Determinación de proteínas*

Las cenizas se calcularon por gravimetría, eliminando la materia orgánica de la biomasa mediante calcinación en una mufla (Nabertherm. Lilienthal, Alemania) a 550°C durante un mínimo de 2 horas.

El análisis elemental se llevó a cabo en un Flash 2000 (Thermo Fisher Scientific. Waltham, MA, EE.UU.) equipado con un detector de conductividad térmica (TCD). Se empleó un reactor de oxidación/reducción a 900°C para determinar el contenido en H, C, N y S, mientras que el contenido en O se analizó en un reactor de pirólisis independiente a 1060°C.

Por último, se determinó el potencial Zeta de la superficie de la célula en un analizador modelo NanoPlus DLS (Micromeritics. Norcross, GA, EE.UU.). Previamente, las muestras de biomasa liofilizada se dispersaron en agua milliQ con una concentración de 0,1 mg/mL.

El sobrenadante que se había ido obtenido diariamente tras el filtrado del peso seco se empleó para cuantificar las concentraciones de amonio, fosfatos y DQO soluble, utilizando kits comerciales Spectroquant 100.638, 100.798 y 114.541 (Merck. Darmstadt, Alemania), respectivamente.

#### Amonio

En un tubo se mezclaron 5 mL del reactivo  $\text{NH}_4$ -1 con 0,2 mL de muestra y una microcuchara rasa del reactivo  $\text{NH}_4$ -2. Se agitó vigorosamente la mezcla hasta que todo estuvo disuelto. Se dejó reposar 15 minutos hasta que las muestras adquirieron una tonalidad verde (Figura 3 – 9) y se midió en un espectrofotómetro Jasco V-630 (Tokio, Japón) a 690 nm.

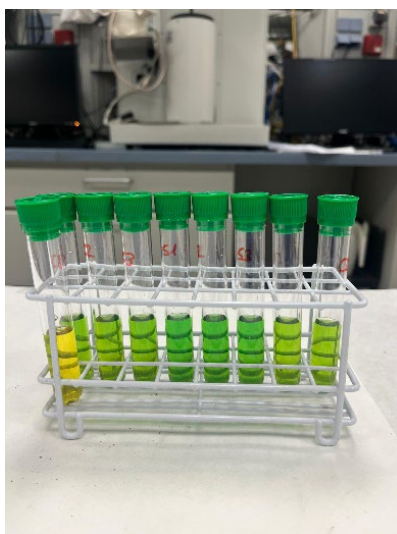


Figura 3 – 9. Determinación de amonio.

El calibrado de amonio, presentado en el anexo 7.2, se llevó a cabo siguiendo este protocolo con diferentes disoluciones elaboradas a partir de una solución patrón comercial de  $\text{NH}_4\text{Cl}$  en  $\text{H}_2\text{O}$  de 1000 mg/L (Merck. Darmstadt, Alemania).

### Fosfatos

En un tubo se adicionaron 8 mL de agua destilada, 0,5 mL de muestra, 0,5 mL del reactivo  $\text{PO}_4\text{-1}$  y una dosis del reactivo  $\text{PO}_4\text{-2}$ . La mezcla se agitó vigorosamente hasta que los reactivos se encontraban completamente disueltos y se dejó en reposo 5 minutos. Transcurrido este tiempo, se midieron en un espectrofotómetro Jasco V-630 (Tokio, Japón) a 420 nm.

El calibrado de los fosfatos que se presenta en el Anexo 7.2 se elaboró a partir de una solución patrón comercial de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  en  $\text{H}_2\text{O}$  de 1000 mg/L (Merck. Darmstadt, Alemania).

### DQO

En las cubetas de reacción del kit se añaden 3 mL de muestra y se mezcla vigorosamente el contenido. A continuación, las cubetas se introducen durante 120 minutos a 148°C en un baño, como se muestra en la Figura 3 – 10. Tras este tiempo, las cubetas se sacan del baño y se dejan enfriar al menos 30 minutos. Una vez enfriadas, se midieron en un espectrofotómetro Jasco V-630 (Tokio, Japón) a 585 nm.

El calibrado que se muestra en el Anexo 7.2. se realizó con una disolución patrón comercial de DQO de 50000 mg/L en  $\text{H}_2\text{O}$  (Merck. Darmstadt, Alemania).



Figura 3 – 10. Determinación de DQO

Finalmente, el crecimiento de la biomasa se ajustó a un modelo cinético de Monod, el cual describe el efecto del sustrato limitante en la tasa de crecimiento específico [332].

$$(10) \mu = \frac{\mu_{max} \cdot S}{k_s + S}$$

Donde  $\mu$  es la tasa de crecimiento específico ( $d^{-1}$ ), calculada con la ecuación (11) [333],  $\mu_{max}$  es la tasa máxima de crecimiento específico ( $d^{-1}$ ),  $S$  la concentración de amonio (mg/L) y  $k_s$  la constante de saturación (mg/L).

$$(11) \mu = \frac{\ln X_f - \ln X_i}{t_f - t_i}$$

Siendo  $X_f$  y  $X_i$  las concentraciones de biomasa (g biomasa seca/L) en los tiempos  $t_f$  y  $t_i$  (días).

#### ❖ **Determinación de los CDEs y mecanismos de eliminación:**

Diariamente se recogieron 30 mL de muestra de los reactores LOM, los cuales fueron centrifugados durante 20 minutos a 3500 rpm en una centrífuga modelo 5810 (Eppendorf. Hamburgo, Alemania). Posteriormente, el sobrenadante se separó del pellet de biomasa y fue filtrado a través de un filtro de nylon de 0,45  $\mu m$ . Las muestras fueron preconcentradas con el método de SPE desarrollado previamente, y 10  $\mu L$  del eluyente fueron inyectados en el HPLC, siguiendo los métodos también previamente desarrollados, para cuantificar la concentración de CDEs en el sobrenadante de los experimentos LOM.

Por otro lado, la biomasa recogida fue lavada con 1 mL de agua Milli-Q y posteriormente centrifugada a 3500 rpm durante 20 minutos. El agua de lavado fue descartada, y la biomasa se resuspendió en 1 mL de metanol. A continuación, la biomasa fue sonicada durante 15 minutos (37kHz, 820 W) en un ultrasonido modelo Elmasonic P (Elma Schmidbauer. Singen, Alemania) para liberar los CDEs bioadsorbidos en la pared celular al metanol. Esta mezcla fue centrifugada nuevamente, separando la fase orgánica que contenía los CDEs bioadsorbidos de la biomasa. Las muestras obtenidas fueron utilizadas para cuantificar la concentración bioadsorbida de CDEs sobre la pared celular mediante HPLC.

Para evaluar la bioacumulación de CDEs en el interior celular, la biomasa obtenida tras la última centrifugación fue resuspendida en 1 mL de metanol y agitada a 900 rpm durante toda la noche. Para asegurar la ruptura de la pared celular, las muestras fueron sonicadas durante 1 h, seguido de una centrifugación de 20 minutos a 3500 rpm. El sobrenadante resultante fue analizado por HPLC, permitiendo cuantificar la concentración de CDEs bioacumulados.

Para estudiar la contribución relativa de los procesos de bioadsorción, bioacumulación y bioeliminación, se estableció el siguiente balance de eliminación

de CDEs, donde el porcentaje de biodegradación se calculó mediante la ecuación ( 12 ):

$$(12) P(\%) = (A_t - A_r - A_d - A_a - A_c) \cdot \frac{100}{A_t}$$

Donde  $A_t$  es la cantidad inicial de cada CDEs añadida al medio ( $\mu\text{g}$  a día 0).  $A_r$  es la cantidad de CDEs presente en el sobrenadante de los experimentos LOM.  $A_d$  es la cantidad de CDEs adsorbida en la pared celular.  $A_c$  es la cantidad de CDEs bioacumulada en el interior de las células.  $A_a$  es la cantidad de CDEs eliminada con mecanismos abióticos, que se corresponde con la cantidad de CDEs en el sobrenadante de los experimentos LO.

Las constantes cinéticas de degradación y los tiempos de vida medio de MeP, PrP, BuP, BP, BPA y E fueron calculados para los experimentos LOM. Según estudios previos, la degradación de CDEs se ajusta a una cinética de pseudo-primer orden, descrita por la ecuación ( 13 ) [264,334].

$$(13) \ln C_t = -kt + \ln C_0$$

Donde  $C_0$  es la concentración inicial de cada contaminante (ppb) a día 0,  $C_t$  es la concentración de CDE a tiempo  $t$ ,  $k$  es la constante de velocidad de eliminación ( $\text{h}^{-1}$ ) y  $t$  es el tiempo de reacción (h).

El tiempo de vida medio ( $t_{1/2}$ ) se calculó de acuerdo con la ecuación ( 14 ) [335]:

$$(14) t_{1/2} = \frac{\ln 2}{k}$$

Donde  $t_{1/2}$  es el tiempo de vida medio (h) y  $k$  es la constante de velocidad de eliminación ( $\text{h}^{-1}$ ).

La actividad enzimática de ambas especies de microalgas se determinó a partir de una modificación del método descrito por Chang et al. (2023) [264]. Para ello, los experimentos LOM dopados con 1 ppm de contaminantes fueron duplicados y, diariamente, se recogieron 10 mL de muestra, que fueron centrifugados durante 20 minutos a 3500 rpm para separar el sobrenadante de la biomasa. El sobrenadante, que contenía las enzimas extracelulares producidas por las microalgas, fue filtrado a través de un filtro de membrana de nylon de 0,22  $\mu\text{m}$ . Posteriormente, este sobrenadante fue dopado nuevamente con la mezcla de contaminantes, hasta alcanzar una concentración final de 30 ppm. La solución resultante fue incubada durante 24 horas en oscuridad, cubriendo los botes con papel aluminio para evitar la exposición a la luz. Transcurrido este tiempo, se tomó una muestra, que fue analizada por HPLC de acuerdo con los métodos desarrollados, con el objetivo de cuantificar la concentración de CDEs. La actividad enzimática se expresó en micromoles de contaminante eliminados por las enzimas extracelulares, por hora y por gramo de biomasa.

### 3.3.3.2. Experimentos abióticos

En la Figura 3 – 11 se resume la metodología seguida en los experimentos abióticos. En este caso, al no existir biomasa presente, el sobrenadante que se recogía diariamente de los experimentos L, O y LO fue destinado exclusivamente a la determinación de la concentración de CDEs. Los 30 mL de sobrenadante fueron filtrados a través de un filtro de membrana de nylon de 0,45  $\mu\text{m}$ , extraído mediante el método de SPE previamente desarrollado y posteriormente analizado por HPLC siguiendo los métodos establecidos.

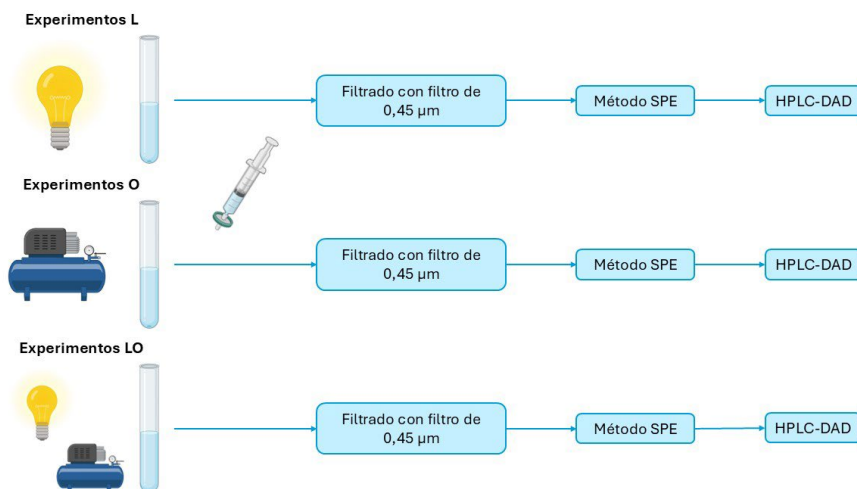


Figura 3 – 11. Resumen del procedimiento experimental seguido con los experimentos abióticos para un sistema de tratamiento biológico. Iconos diseñados con Biorender.

Con el objetivo de evaluar si alguno de los iones presentes en el ARS podía contribuir a la degradación de los CDEs, se realizaron experimentos adicionales en condiciones O y LO utilizando agua milliQ como medio, con una duración de un día solamente. Los sobrenadantes de estos ensayos se evaluaron del mismo modo, tal y como se indica en la Figura 3 – 11.

Finalmente, las constantes cinéticas de degradación y el tiempo de vida medio se calcularon para los experimentos O y LO empleando el mismo procedimiento descrito previamente para los experimentos LOM, a partir de las ecuaciones ( 13 ) y ( 14 ).

### 3.3.4. Análisis estadístico

Todos los experimentos fueron llevados a cabo por triplicado. Se aplicó una prueba t de Student para evaluar las posibles diferencias en el crecimiento de la biomasa, tanto en presencia como en ausencia de CDEs, así como en el pH y el consumo de nutrientes. Además, se utilizó también para analizar diferencias en la composición bioquímica y elemental de la biomasa y en el potencial Zeta,

comparando las condiciones con y sin CDEs. Adicionalmente, esta prueba estadística se empleó para examinar las posibles diferencias en la degradación de CDEs entre los experimentos LOM y los ensayos abióticos.

### 3.4. Experimentos de digestión anaerobia (DA) para la revalorización de la biomasa

#### 3.4.1. Materiales

- El fango empleado como inóculo en la digestión anaerobia procedía de la recirculación de la digestión primaria de una EDAR urbana. Este fango presentó, de media, unos sólidos totales del  $1,41 \pm 0,50\%$  (en base húmeda), una humedad del  $98,59 \pm 0,50\%$ , unos sólidos volátiles del  $1,03 \pm 0,32\%$  (en base húmeda), unas cenizas del  $98,97 \pm 0,32\%$  y una densidad de  $0,99 \text{ g/mL}$ .
- NaCl,  $\text{CaCl}_2$ ,  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  y  $\text{NH}_4\text{Cl}$  (Sigma-Aldrich. St. Louis, MO, EE.UU.)
- Metilparabeno (MeP) (Sigma-Aldrich)
- Propilparabeno (PrP) (Sigma-Aldrich)
- Butilparabeno (BuP) (Sigma-Aldrich)
- Benzofenona (BP) (Sigma-Aldrich)
- Bisfenol A (BPA) (Sigma-Aldrich)
- Estrona (E) (Sigma-Aldrich)
- Metanol grado LC-MS (Scharlau. Barcelona, España)
- Sistema Autowomatic plus 1+2 (Wasserlab. Barbatáin, España) para obtener agua milli-Q y destilada
- Cloroformo (Scharlau)
- Ácido sulfúrico al 98% (Scharlau)
- Fenol (Sigma Aldrich)
- Reactivo Folin (Sigma Aldrich).
- Kits de amonio, fosfatos y test en cubetas de DQO soluble y nitrógeno total (Merck. Darmstadt, Alemania)
- Disolución patrón de nitrógeno total (Merck)

#### 3.4.2. Instalación experimental

En primer lugar, se cultivaron *Scenedesmus* sp. y *C. vulgaris* en ARS en fotobiorreactores de 5L (Figura 3 - 12), con un volumen total de 20 L. En el día 0, cada fotobiorreactor fue llenado con ARS e inóculo hasta ajustar la concentración inicial a  $0,1 \text{ g/L}$ . Además, los cultivos fueron dopados con 1 ppm de cada contaminante, para lo que se tuvieron que preparar disoluciones stock en metanol más concentradas, de 6000 ppm.



Figura 3 - 12. Fotobiorreactores empleados en el cultivo de *Scenedesmus* sp. y *C. vulgaris*.

Cada fotobiorreactor fue aireado continuamente con un caudal de aire de 2,5 L/min, impulsado por bombas de aire. Antes de alcanzar los cultivos, el aire fue filtrado a través de un filtro de PTFE de 0,2  $\mu\text{m}$ . La iluminación se llevó a cabo mediante una carcasa metálica con fluorescentes de 8 W, estableciendo un fotoperiodo de 12 horas de luz y 12 horas de oscuridad.

La biomasa cultivada se sometió a un pretratamiento de hidrólisis térmica, que se llevó a cabo en un reactor discontinuo mezcla perfecta (Figura 3 - 13). El reactor fue llenado con volumen total de 75 mL, añadiendo 8,5 g de esta biomasa húmeda por reacción y completando el volumen con sobrenadante procedente del cultivo.

El reactor contaba con una camisa de calentamiento y un sistema de regulación de temperatura, que fue ajustado a 140°C. La presión de trabajo fue la que se alcanzó en el reactor a esta temperatura, 3 bares. La reacción tuvo una duración de 20 minutos y se mantuvo con agitación constante a 300 rpm, con el objetivo de garantizar la homogeneidad de la mezcla.

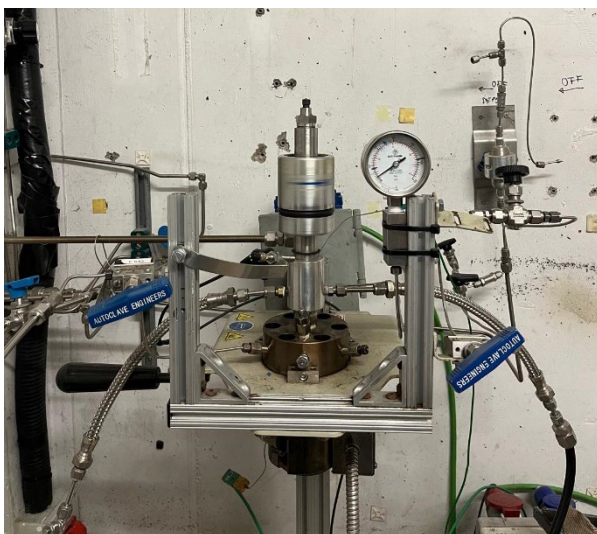


Figura 3 - 13. Reactor empleado en la hidrólisis térmica

Posteriormente, la digestión anaerobia se realizó en botellas de vidrio de 100 mL, selladas con cápsulas de aluminio y septum de goma para evitar la fuga de gases. Las botellas fueron incubadas durante 32 días en una estufa modelo INCUBAT 150L (J. P. Selecta. Barcelona, España) a 37°C (condiciones mesofílicas), tal y como se muestra en la Figura 3 - 14.



Figura 3 - 14. Instalación experimental para la producción de biogás.

Cada muestra se preparó con una relación inóculo:sustrato de 2:1 en gramos de SV [285], siendo el sustrato la biomasa de microalgas pretratada o sin pretratar. Para ello, se añadieron 44 mL de inóculo en cada botella, junto con la cantidad correspondiente de biomasa, y se enrasó hasta 67 mL con el sobrenadante del cultivo

(biomasa sin pretratar) o con el sobrenadante de la hidrólisis térmica (biomasa pretratada). Además, se realizaron controles solo con inóculo, en los que se añadieron 44 mL de fango, enrasado hasta 67 mL con agua desionizada. Antes de la incubación, las botellas fueron inertizadas con nitrógeno para eliminar el oxígeno presente.

Las muestras gaseosas fueron analizadas mediante cromatografía de gases en un GC 4000A, equipado con un TCD (East & West Analytical Instruments. Beijing, China). Se utilizó helio como gas portador, a una presión de 5 bar. El cromatógrafo contaba con una columna Carboxen 1010, de 30 m de longitud y 0,53 mm de diámetro (Supelco. Bellefonte, PA, USA).

#### 3.4.3. *Procedimiento experimental*

La biomasa cultivada se cosechó a los 14 días, una vez alcanzada la fase estacionaria. Para su separación del sobrenadante se empleó una centrífuga modelo Dilitcen 22 R (Ortoalresa. Madrid, España), realizando tandas de centrifugado de 1 h a 4000 rpm, con una capacidad total de 4 L de cultivo por tanda. Con el fin de preservar las propiedades de la biomasa, el proceso se llevó a cabo a una temperatura de 20°C. Parte del sobrenadante se destinó al proceso de hidrólisis térmica, y otra parte se empleó en la digestión anaerobia de muestras de biomasa sin pretratar.

De la biomasa cosechada se separaron 8,5 g, a los que se añadieron 79 mL de sobrenadante del cultivo. Esta mezcla fue centrifugada (Eppendorf 5910. Hamburgo, Alemania) a 4000 rpm durante 10 minutos y se extrajeron 4 mL del sobrenadante para analizar las concentraciones iniciales de amonio, fosfatos y DQO solubles, empleando para ello kits comerciales Spectroquant 100.638, 100.798 y 114.541 (Merck. Darmstadt, Alemania), según los protocolos descritos anteriormente. El resto de la mezcla fue sometida a hidrólisis térmica y, tras finalizar el proceso, se centrifugó nuevamente a 4000 rpm durante 30 minutos. La biomasa separada fue utilizada como sustrato en la digestión anaerobia de las muestras pretratadas, mientras que el sobrenadante se empleó parcialmente para la determinación de las concentraciones de amonio, fosfatos y DQO tras la hidrólisis térmica y el resto se destinó también a la digestión anaerobia de las muestras pretratadas.

Adicionalmente, la biomasa cosechada fue caracterizada mediante la determinación del contenido en carbohidratos, lípidos, proteínas y cenizas, así como su composición elemental, siguiendo los protocolos indicados en la sección 3.3.3.1.

Para llevar a cabo la digestión anaerobia, fue necesario determinar la cantidad de sustrato a añadir para mantener la relación inóculo:sustrato de 2:1 en cada botella. Para ello, se calcularon los sólidos totales (ST) y volátiles (SV) de la biomasa con y sin pretratamiento (sustrato), así como del fango (inóculo). El cálculo de los ST se realizó secando una muestra de 1 g a 110°C durante un mínimo de 8 horas en una mufla,

hasta alcanzar un peso constante. Posteriormente, la muestra fue calcinada a 550°C durante 2 horas para determinar los SV por gravimetría.

La producción de biogás generado en las botellas de digestión anaerobia fue monitorizada diariamente las dos primeras semanas. Después, cuando la producción comenzó a disminuir, las mediciones se realizaron cada dos o tres días. En primer lugar, la presión de cada botella fue medida con un sensor modelo 400 (Vernier. Beaverton, EE.UU.), el cual iba conectado a un ordenador y empleaba el software Vernier Graphical Analysis. A continuación, se tomaba una muestra de gas de 500 µL, que era inyectada manualmente en el detector de gases para su análisis. Las botellas fueron purgadas diariamente con nitrógeno después de la toma de muestras.

Además, al inicio del experimento, se prepararon tres réplicas adicionales de cada ensayo para llevar a cabo el análisis del sobrenadante inicial. Tanto estas muestras iniciales como las finales, obtenidas tras 32 días de incubación, fueron centrifugadas a 4000 rpm durante 9 minutos, separando el sobrenadante del sólido. Los sobrenadantes fueron filtrados a través de un filtro de membrana de nylon de 0,45 µm (GVS. Bolonia, Italia). Posteriormente, se analizaron las concentraciones de amonio fosfatos, DQO y nitrógeno total (NT) solubles utilizando kits comerciales Spectroquant 100.638, 100.798, 114.541 y 114.763 (Merck. Darmstadt, Alemania), respectivamente.

#### Nitrógeno total (NT):

Se vertieron 1 mL de la muestra, 9 mL de agua destilada, una microcuchara rasa del reactivo N-1K y 6 gotas del reactivo N-2K en tubos a presión, mezclando todo. La mezcla se mantuvo durante 1 hora a 120°C en un baño y, tras enfriarse a temperatura ambiente, se tomó 1 mL de las muestras disgregadas y se añadió a una cubeta de reacción del test (Figura 3 - 15). Finalmente, se adicionó 1 mL de reactivo N-3K a la cubeta de reacción y, tras 10 minutos de reposo, las muestras fueron medidas a 345 nm en un espectrofotómetro Jasco V-630 (Tokio, Japón).

El calibrado del nitrógeno total se elaboró a partir de una solución comercial de 100 mg N/l en H<sub>2</sub>O (Merck. Darmstadt, Alemania) y se presenta en el Anexo 7.2.

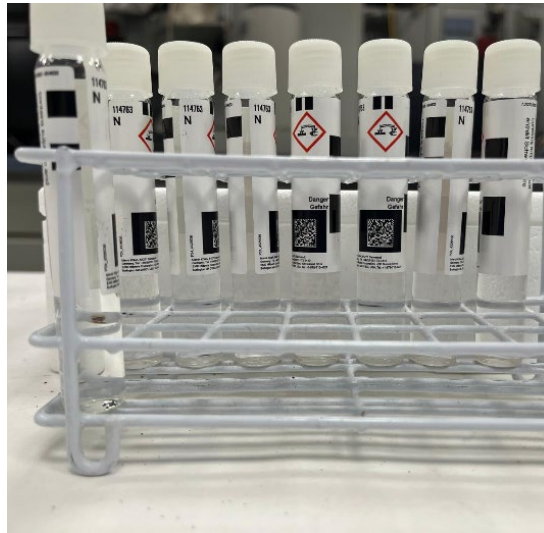


Figura 3 - 15. Determinación de nitrógeno total (NT).

#### 3.4.4. Cálculos de la producción de biogás

Para la elaboración de las curvas de potencial bioquímico de metano (BMP), el área del pico de metano fue correlacionada con su concentración mediante un calibrado previo con el cromatógrafo de gases. A partir de esta relación, se aplicaron las ecuaciones que se presentan a continuación [336]:

$$(15) \text{ BMP} = \frac{V_{TCH_4}(C.E.)}{g \text{ SV}}$$

$$(16) V_{TCH_4}(C.E.) = V_{TCH_4}(C.E.) + V_{CH_4 \text{ disuelto}}(C.E.)$$

$$(17) V_{CH_4}(C.E.) = \frac{n_{CH_4} \cdot R \cdot T_{C.E.}}{P_{C.E.}}$$

$$(18) n_{CH_4} = (A_{CH_4} \cdot m - n) \cdot \frac{V_C}{V_p}$$

$$(19) V_{CH_4 \text{ disuelto}}(C.E.) = \frac{n_{CH_4 \text{ disuelto}} \cdot R \cdot T_E}{\Delta P}$$

$$(20) n_{CH_4 \text{ disuelto}} = M_{CH_4 \text{ disuelto}} \cdot V_U$$

$$(21) M_{CH_4 \text{ disuelto}} = \frac{M_{H_2O} \cdot X_{CH_4 \text{ disuelto}}}{1 - X_{CH_4 \text{ disuelto}}}$$

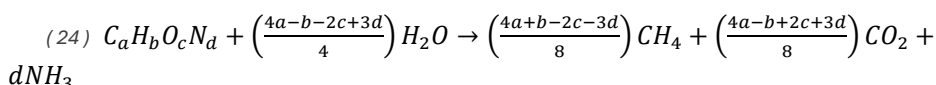
$$(22) X_{CH_4 \text{ disuelto}} = \frac{\Delta P}{H_{CH_4}}$$

$$(23) H_{CH_4} = 10^{\left(\frac{-673,74}{T_E} + 6,88\right)}$$

Donde:

- BMP es el potencial bioquímico de metano (L CH<sub>4</sub>/g SV).
- V<sub>TCH<sub>4</sub></sub> (C.E.) es el volumen total de CH<sub>4</sub> en condiciones estándar (L), que se corresponde con la suma del volumen de metano presente en la cabeza de la botella más el volumen que se disuelve en el fango.
- g SV son los sólidos volátiles iniciales del sustrato.
- V<sub>CH<sub>4</sub></sub> (C.E.) el volumen de CH<sub>4</sub> en condiciones estándar que se almacena en cabeza de botella (L).
- V<sub>CH<sub>4</sub>disuelto</sub> (C.E.) el volumen de CH<sub>4</sub> disuelto en el fango (L) en condiciones normales.
- n<sub>CH<sub>4</sub></sub> los moles de CH<sub>4</sub> calculados a partir de la recta de calibrado de moles de metano frente al área relativa de pico, se corresponden con los moles presentes en la cabeza del digestor.
- R es la constante de los gases ideales (0,082 atm·L/K·mol).
- T<sub>CE</sub> es la temperatura en condiciones estándar (273 K).
- P<sub>CE</sub> es la presión en condiciones estándar (1 atm).
- A<sub>CH<sub>4</sub></sub> es el área del pico de metano.
- m es la pendiente de la recta de calibrado (2·10<sup>-12</sup>).
- n es la ordenada en el origen de la recta de calibrado (-2·10<sup>-7</sup>).
- V<sub>C</sub> es el volumen de cabeza o volumen libre de la botella (0,033 L).
- V<sub>P</sub> es el volumen de muestra pinchado (500 µL).
- n<sub>CH<sub>4</sub>disuelto</sub> son los moles de CH<sub>4</sub> disueltos en el fango (mol).
- T<sub>E</sub> es la temperatura a la que se lleva a cabo la digestión anaerobia (310 K).
- ΔP es el incremento de presión entre el control solo con inóculo y las muestras con mezcla de sustrato e inóculo.
- M<sub>CH<sub>4</sub>disuelto</sub> es la concentración molar del CH<sub>4</sub> disuelto en el fango (mol/L).
- V<sub>U</sub> es el volumen útil de la botella (0,067 L).
- M<sub>H<sub>2</sub>O</sub> es la concentración molar del agua añadida y presente en el propio fango (mol/L).
- X<sub>CH<sub>4</sub>disuelto</sub> es la fracción molar del CH<sub>4</sub> disuelto en el fango.
- H<sub>CH<sub>4</sub></sub> es la constante de Henry para el CH<sub>4</sub> (atm).

El rendimiento máximo teórico de metano (TMP) se fundamenta en la fórmula general de la composición del sustrato (C<sub>a</sub>H<sub>b</sub>O<sub>c</sub>N<sub>d</sub>), calculada a partir de su composición elemental. Su transformación en CH<sub>4</sub>, CO<sub>2</sub> y NH<sub>3</sub> por los microorganismos anaerobios se describe en la ecuación ( 24 ) [337]:



De este modo, el TMP se puede calcular según la ecuación ( 25 )

$$(25) Y_{CH_4} = \left( \frac{\frac{4a+b-2c-3d}{8}}{12a+b+16c+14d} \right) \cdot V_m \cdot 1000$$

Donde  $Y_{CH_4}$  se corresponde con el TMP (mL  $CH_4$ /g SV) y  $V_m$  es el volumen molar normal de metano (22,4 L).

Además, se estimó la biodegradabilidad del sustrato utilizando la siguiente ecuación [337]:

$$(26) \text{Biodegradabilidad} = \frac{\text{Producción de metano experimental}}{\text{Producción de metano teórica}}$$

Donde la producción de metano teórica corresponde al TMP y la producción de metano experimental se asocia con el BMP obtenido en el día 32.

Finalmente, las curvas BMP así obtenidas fueron ajustadas a un modelo cinético de primer orden para calcular la constante cinética de primer orden y el potencial máximo de producción de metano, de acuerdo con las siguientes ecuaciones [292]:

$$(27) r = k \cdot (P - Y_{CH_4})$$

$$(28) Y_{CH_4} = P \cdot (1 - e^{-k \cdot t})$$

Donde  $r$  es la velocidad de producción de metano (mL  $CH_4$ /g SV·d),  $Y_{CH_4}$  la producción de metano (mL  $CH_4$ /g SV),  $P$  el potencial máximo de producción de metano (mL  $CH_4$ /g SV),  $k_H$  la constante cinética de primer orden ( $d^{-1}$ ) y  $t$  el tiempo del experimento (d).

Sin embargo, la producción que se obtuvo con la biomasa pretratada de *C. vulgaris* no ajustó a un modelo de primer orden, ya que presentó una fase lag al inicio del experimento. Por este motivo, los resultados se ajustaron a un modelo de Gompertz modificado [337]:

$$(29) Y_{CH_4} = P \cdot \exp \left\{ -\exp \left[ \frac{R_m \cdot \exp(1)}{P} \cdot (\lambda - t) + 1 \right] \right\}$$

Siendo  $Y_{CH_4}$  la producción de metano (mL  $CH_4$ /g SV),  $P$  el potencial máximo de producción de metano (mL  $CH_4$ /g SV),  $R_m$  la tasa máxima de producción de metano (mL/d),  $\lambda$  la duración de la fase lag (d) y  $t$  el tiempo del experimento (d).

### 3.4.5. Análisis estadístico

Todos los experimentos de digestión anaerobia se llevaron a cabo por triplicado para evaluar su repetibilidad, al igual que las caracterizaciones de la biomasa y los ensayos de determinación de nutrientes de los sobrenadantes de la hidrólisis térmica y del biogás.

Para evaluar las posibles diferencias entre la composición bioquímica y elemental de la biomasa cosechada en este experimento y la del experimento del sistema

empleado como biológico, se aplicó la prueba t de Student. Esta prueba estadística también se utilizó para comparar los resultados de la caracterización del sobrenadante antes y después de la hidrólisis térmica y de la digestión anaerobia.

### 3.5. Experimentos del sistema basado en microalgas como tratamiento terciario.

#### 3.5.1. Materiales

- El agua residual empleada en el cultivo fue recogida de la salida de la decantación secundaria de una EDAR urbana.
- Metilparabeno (MeP) (Sigma-Aldrich. St. Louis, MO, EE.UU.)
- Propilparabeno (PrP) (Sigma-Aldrich)
- Butilparabeno (BuP) (Sigma-Aldrich)
- Benzofenona (BP) (Sigma-Aldrich)
- Bisfenol A (BPA) (Sigma-Aldrich)
- Estrona (E) (Sigma-Aldrich)
- Metanol grado LC-MS (Scharlau. Barcelona, España)
- Sistema Autwomatic plus 1+2 (Wasserlab. Barbatáin, España) para obtener agua milli-Q y destilada
- Cloroformo (Scharlau)
- Ácido sulfúrico al 98% (Scharlau)
- Fenol (Sigma Aldrich)
- Reactivo Folin (Sigma Aldrich).
- Kits de amonio, fosfatos, nitratos, nitritos y test en cubetas de DQO y nitrógeno total (Merck. Darmstadt, Alemania)
- Disolución patrón de nitratos y nitritos (Merck)

#### 3.5.2. Instalación experimental

En primer lugar, se evaluó cuál de las dos especies de microalgas, *Scenedesmus* sp. o *C. vulgaris*, era más adecuada para su cultivo en agua residual real (ARR). Para ello, se llevaron a cabo cultivos independientes en reactores batch con un volumen de trabajo de 500 mL, utilizando ARR como medio de cultivo. La densidad inicial de microalga se estableció en 0,1 g/L.

Al igual que en configuraciones anteriores, la aireación se proporcionó mediante bombas de aire, suministrando un caudal constante de 3,5 L/min, previamente filtrado con un filtro de 0,45  $\mu\text{m}$ . La iluminación proporcionó una irradiancia de 108  $\mu\text{mol}\cdot\text{fotón}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ , con un fotoperiodo de 12 horas de luz y 12 horas de oscuridad.

Una vez seleccionada la especie que presentó un mejor crecimiento, se procedió a evaluar la eliminación de la mezcla de CDEs en presencia de microalgas, luz y oxígeno (LOM), así como su degradación abiótica bajo condiciones de luz y oxígeno

(LO), todo ello en ARR. Todos los experimentos se realizaron en reactores batch de 5 L de volumen de trabajo y durante 7 días.

#### 3.5.2.1. Experimentos LOM

Los reactores de 5 L fueron llenados con ARR e inoculados con *Scenedesmus* sp., con una concentración inicial de 0,1 g/L. Cada reactor fue dopado con 1 ppm de la mezcla de contaminantes, a partir de la disolución stock de 6000 ppm y, además, se incluyeron controles sin CDES. En la Figura 3 - 16 se muestra el montaje del sistema de cultivo utilizado para los experimentos LOM.



Figura 3 - 16. Sistema de cultivo de los experimentos LOM de 5 L.

Todos los reactores fueron aireados mediante bombas de aire, con un caudal de 3,5 L/min de aire previamente filtrado. El sellado se realizó con tapones de goma, y la aireación se implementó mediante tubos de plástico. La iluminación del cultivo se efectuó con una carcasa metálica con fluorescentes de 8 W, estableciendo un fotoperiodo de 12 horas de luz y 12 horas de oscuridad.

#### 3.5.2.2. Experimentos abióticos

Los reactores en los experimentos LO fueron llenados con 5 L de ARR y dopados con 1 ppm de la mezcla de CDEs. Además, se sometieron a las mismas condiciones de aireación e iluminación que los experimentos LOM. Para inhibir la proliferación microbiana, se añadió a cada reactor un 0,01% v/v de azida de sodio.

## Nitratos

## Nitritos

Para determinar que especie de microalga presentaba un mejor crecimiento en ARR, se tomaron diariamente 12 mL de cada cultivo y se obtuvo el peso seco

siguiendo el protocolo descrito en la sección 3.3.3.1. El sobrenadante obtenido tras el filtrado fue empleado para cuantificar las concentraciones de nitratos y fosfatos mediante kits comerciales Spectroquant 109.713 y 100.798 (Merck. Darmstadt, Alemania).

### 3.5.3.1. Experimentos LOM

En la Figura 3 - 18 se muestra un esquema del procedimiento experimental seguido durante los ensayos LOM en configuración de tratamiento terciario. Cada día se tomaron 12 mL del cultivo para medir el crecimiento de la biomasa mediante el método de peso seco descrito en la sección 3.3.3.1. Asimismo, se registró el pH del cultivo utilizando un pHmetro (XS Instruments. Módena, Italia). El sobrenadante resultante tras la estimación del peso seco se empleó para cuantificar la concentración de nitratos, fosfatos y DQO soluble con kits comerciales Spectroquant 109.713, 100.798 y 114.541 (Merck. Darmstadt, Alemania), respectivamente. Además, el crecimiento de la biomasa se ajustó a un modelo cinético de Monod, de acuerdo con lo presentado en la sección 3.3.3.1, empleando como sustrato la concentración de nitratos.

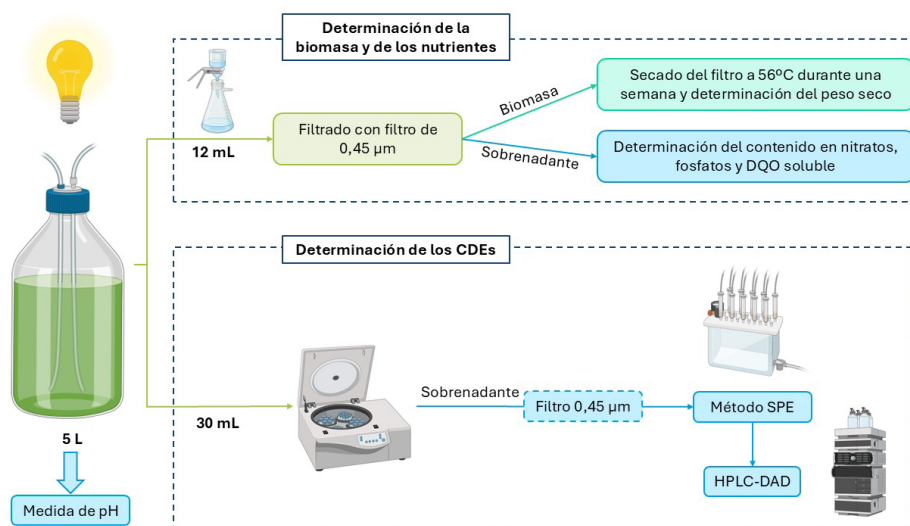


Figura 3 - 18. Resumen del procedimiento experimental seguido con los experimentos LOM para un sistema de tratamiento terciario. Iconos diseñados con Biorender.

Adicionalmente, se recogieron 30 mL que fueron centrifugados durante 20 minutos a 3500 rpm en una centrífuga modelo 5810 (Eppendorf. Hamburgo, Alemania) y filtrados mediante un filtro de nylon de 0,45 µm (Agilent Technologies. Santa Clara, CA, EE.UU.). Las muestras resultantes fueron preconcentradas según el método de SPE previamente desarrollado y posteriormente analizadas por HPLC siguiendo los métodos de la sección 3.2.2, con el objetivo de medir la concentración de CDEs remanente en el sobrenadante.

Para calcular constantes cinéticas de degradación ( $k$ ) y los tiempos de vida medios ( $t_{1/2}$ ) se emplearon las ecuaciones ( 13 ) y ( 14 ).

Finalmente, la biomasa obtenida el séptimo día fue caracterizada en cuanto a su composición bioquímica y elemental, de acuerdo con el protocolo establecido en la sección 3.3.3.1.

#### 3.5.3.2. Experimentos abióticos

Como se muestra en la Figura 3 - 19, diariamente se recogieron 30 mL de cultivo de cada fotobiorreactor, que fueron filtrados mediante un filtro de nylon de  $0,45\ \mu\text{m}$ . Al igual que en los experimentos LOM, estas muestras fueron preconcentradas utilizando el método de SPE anteriormente desarrollado, y la concentración de CDEs presente en el sobrenadante fue determinada mediante análisis por HPLC.

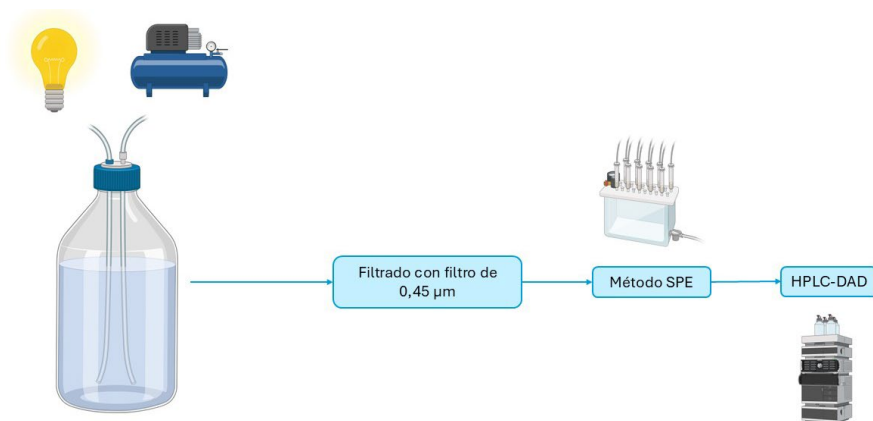


Figura 3 - 19. Resumen del procedimiento experimental seguido con los experimentos LO para un sistema de tratamiento terciario. Iconos diseñados con Biorender.

#### 3.5.4. Análisis estadístico

Todos los experimentos se llevaron a cabo por triplicado. Se utilizó una prueba  $t$  de Student para evaluar las posibles diferencias significativas entre el crecimiento de *Scenedesmus* sp y *C. vulgaris* en ARR. Además, esta prueba se empleó también para analizar el crecimiento de *Scenedesmus* sp., el pH, la composición bioquímica y elemental de la biomasa final y la eliminación de nutrientes en presencia y ausencia de CDEs.

# 04

**RESULTADOS**

**Y DISCUSIÓN**



## 4. Resultados y discusión

### 4.1. Desarrollo de un método analítico para la detección de CDEs en aguas residuales

Para realizar un estudio detallado sobre la eliminación de CDEs en aguas residuales mediante el uso de microalgas, se desarrollaron dos técnicas analíticas complementarias para la detección y cuantificación de estos contaminantes. En primer lugar, fue necesario pretratar las muestras acuosas para concentrarlas y eliminar posibles interferencias, utilizando una técnica de extracción en fase sólida (SPE) y, posteriormente, se empleó un método de cromatografía líquida basado en HPLC para la cuantificación de estos contaminantes.

Para el desarrollo de estos métodos, se empleó un enfoque inverso, estableciendo primero el método de cromatografía líquida con HPLC. Esto permitió posteriormente llevar a cabo un análisis pormenorizado de las variables que afectan a la SPE, con el fin de evaluar su impacto en la recuperación de cada CDEs, utilizando la cuantificación obtenida mediante HPLC.

Se seleccionaron seis CDEs de diversas familias, comúnmente presentes en las aguas residuales: MeP, PrP, BuP, BP, BPA y E [338–340]. Además, dado que el procedimiento de extracción depende de las propiedades de los analitos, estos compuestos fueron específicamente seleccionados por su polaridad moderada [341], con el fin de desarrollar un único método de SPE para todos ellos.

#### 4.1.1. Método de cromatografía líquida: HPLC-DAD

Como se ha comentado previamente, el primer paso fue elaborar el método de detección y cuantificación de la mezcla de CDEs seleccionado por HPLC-DAD.

##### 4.1.1.1. Método 1

La selección de longitudes de onda se basó en los espectros de absorción UV-visible de los compuestos, mostrados en la Figura 4 - 1. Es habitual seleccionar la longitud de onda de absorbancia máxima de una molécula para su cuantificación en HPLC, ya que permite una mayor sensibilidad en la detección y cuantificación del analito al maximizarse la relación señal/ruido [342]. Los parabenos (Figura 4 - 1 (a), (b) y (c)) exhibieron un máximo de absorbancia alrededor de 254 nm, por lo que se empleó esta longitud de onda para su cuantificación. BP mostró un espectro similar a los parabenos (Figura 4 - 1 (d)), con absorción predominantemente en 254 nm. Por último, BPA y E presentaron un máximo de absorción a 210 nm, longitud de onda utilizada para su cuantificación. Esas longitudes de onda están en consonancia con las empleadas en estudios previos [343–345].

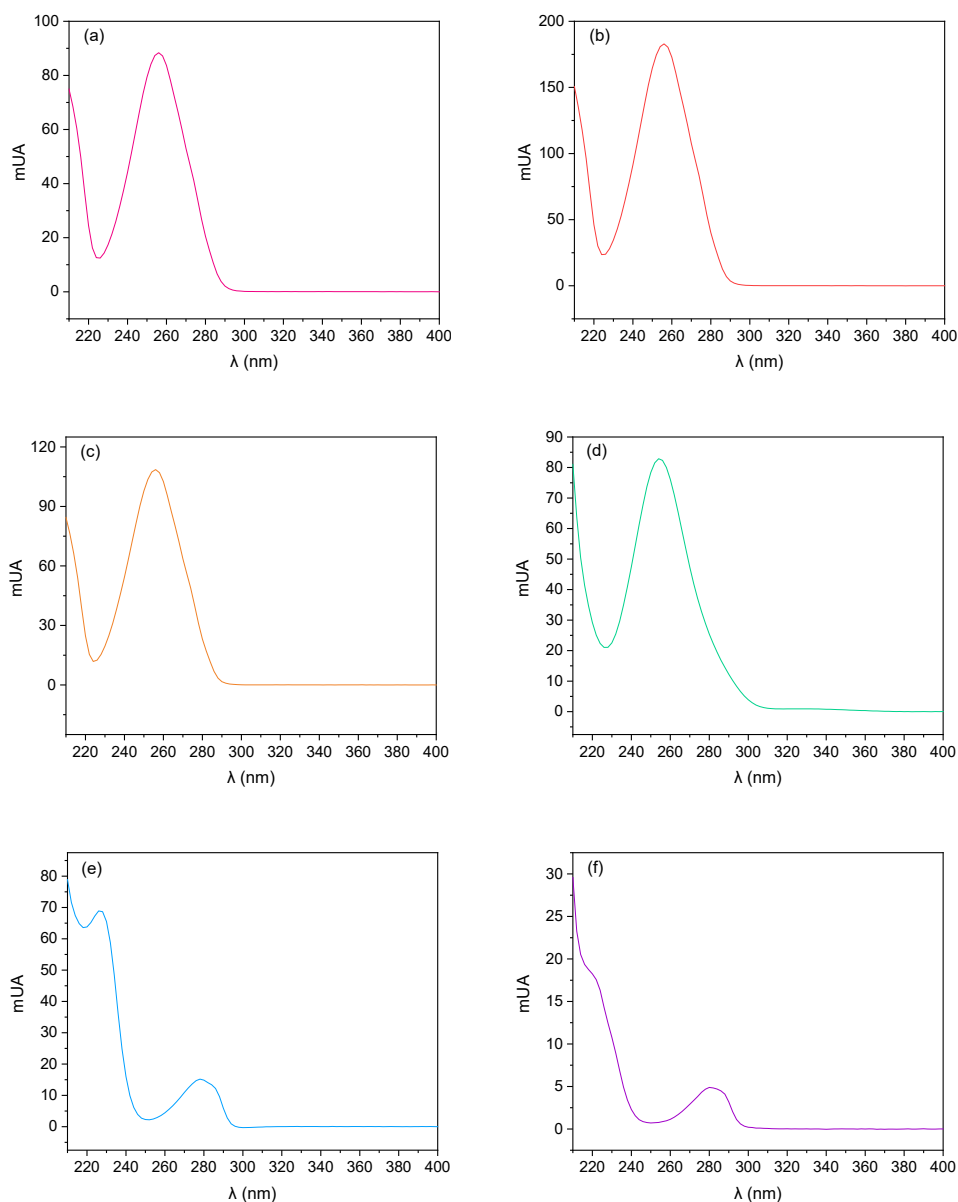


Figura 4 - 1. Espectros de absorción de (a) MeP, (b) PrP, (c) BuP, (d) BP, (e) BPA y (f) E.

De acuerdo con la bibliografía se seleccionó una columna con relleno C18 como fase estacionaria [346–348]. La fase móvil consistió en una mezcla de acetonitrilo (ACN) y agua en diferentes proporciones, como se presenta en la Tabla 4 - 1. Inicialmente, se desarrolló un método de cromatografía con elución isocrática, ya que suele ser una forma de trabajo más rápida, evita que se “pierdan picos” y elimina el ruido en la línea base [324]. La temperatura de la columna se estableció en 35°C, el volumen de inyección de muestra fueron 10  $\mu$ L y el caudal de fase móvil 0,5 mL/min.

Tabla 4 - 1. Método isocrático para la detección del mix de CDEs.

| Tiempo (min) | ACN (%) | H <sub>2</sub> O (%) |
|--------------|---------|----------------------|
| 0,00         | 45,00   | 55,00                |
| 12,00        | 45,00   | 55,00                |

Los cromatogramas obtenidos con las condiciones de cromatografía anteriormente mencionadas para un patrón de 15 ppm de la mezcla de compuestos preparado en metanol se presentan en la Figura 4 - 2. Además, los tiempos de retención de cada uno de los contaminantes aparecen en la Tabla 4 - 2.

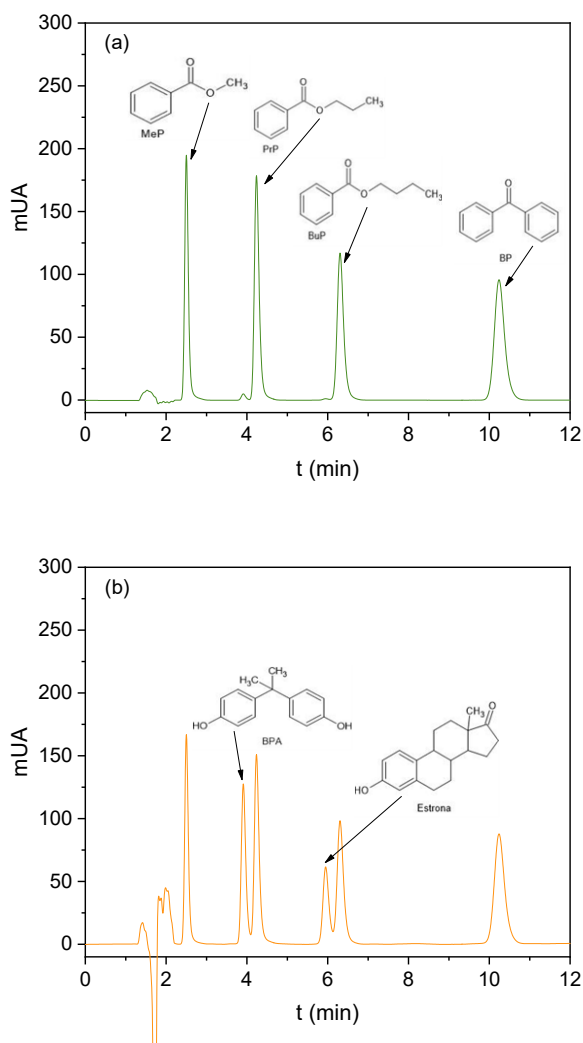


Figura 4 - 2. Cromatogramas de la mezcla de CDEs para (a) parabenos y BP a 254 nm y para (b) BPA y E a 210 nm.

Tabla 4 - 2. Tiempos de retención de MeP, PrP, BuP, BP, BPA y E con el método isocrático.

| Compuesto | Tiempo de retención (min) | Longitud de onda (nm) |
|-----------|---------------------------|-----------------------|
| MeP       | 2,501                     | 254                   |
| BPA       | 3,911                     | 210                   |
| PrP       | 4,237                     | 254                   |
| E         | 5,949                     | 210                   |
| BuP       | 6,306                     | 254                   |
| BP        | 10,241                    | 254                   |

Como se observa en la Figura 4 - 2, este método permite identificar los CDEs de interés, por lo que se procedió a evaluar su idoneidad de acuerdo con las recomendaciones en una serie de parámetros. Los parámetros que suelen emplearse con este fin son el factor de asimetría ( $A_s$ ), la resolución de picos ( $R_s$ ), el número teórico de platos ( $N$ ) y el factor de retención o de capacidad ( $k'$ ).

#### ❖ Factor de asimetría ( $A_s$ ):

La simetría perfecta de un pico se alcanza cuando el valor de  $A_s$  es 1. Si  $A_s$  es menor que 1, los picos muestran asimetría negativa con cola delante o “*fronting*”. Por otro lado, si  $A_s$  es mayor que 1, los picos presentan asimetría positiva con cola detrás o “*tailing*”. Los valores óptimos de este factor están entre  $0,8 < A_s < 1,5$ -1,8 [349]. Como se muestra en la Tabla 4 - 3, todos los factores de asimetría obtenidos estaban dentro de este rango. Esto indica que los picos eran bastante simétricos, a pesar de que los valores de  $A_s$  se encuentren ligeramente por encima de 1, presentando pequeñas colas detrás.

Tabla 4 - 3. Factores de asimetría obtenidos con el HPLC para cada uno de los contaminantes.

| Compuesto | $A_s$ |
|-----------|-------|
| MeP       | 1,20  |
| PrP       | 1,29  |
| BuP       | 1,28  |
| BP        | 1,19  |
| BPA       | 1,32  |
| E         | 1,08  |

#### ❖ Resolución de picos ( $R_s$ ):

En cuanto a la resolución, esta debe de ser al menos de 1,5 en relación con los demás compuestos del cromatograma [350]. En la Tabla 4 - 4 se presentan todos los valores de  $R_s$  obtenidos de cada pico respecto al inmediatamente anterior y posterior, para cada uno de los compuestos analizados. Los picos más cercanos que podrían presentar problemas de resolución son los de BPA con PrP y los de E con BuP (Figura 4 - 2 (b)). Las  $R_s$  alcanzadas para ambos casos fueron de 2,58 y de 2,13 respectivamente, ambas superiores a 1,5. El resto de  $R_s$  fueron casi 10 veces

superiores a este requisito, por lo que la separación cromatográfica con este método se puede considerar adecuada.

Tabla 4 - 4. Resoluciones obtenidas para cada uno de los contaminantes respecto del pico anterior y posterior.

| Compuesto | R <sub>s</sub> con el pico anterior | R <sub>s</sub> con el pico posterior |
|-----------|-------------------------------------|--------------------------------------|
| MeP       | 6,84                                | 14,44                                |
| PrP       | 14,44                               | 12,56                                |
| BuP       | 12,56                               | 15,96                                |
| BP        | 15,96                               | -                                    |
| BPA       | 12,03                               | 2,58                                 |
| E         | 11,25                               | 2,13                                 |

#### ❖ **Número teórico de platos (N):**

El número de platos teóricos es un parámetro que expresa la eficiencia de separación en un método cromatográfico. Cada plato teórico representa un equilibrio, por lo que un mayor número de platos indica una mejor resolución, ya que implica más equilibrios alcanzados [351]. Para una separación eficiente, N debe superar los 2000 [352]. Como se muestra en la Tabla 4 - 5, en todos los casos el valor de N es significativamente mayor que este límite, lo que confirma la alta eficiencia de separación de la columna utilizada.

Tabla 4 - 5. Número teórico de platos obtenidos para cada uno de los contaminantes.

| Compuesto | N        |
|-----------|----------|
| MeP       | 10545,11 |
| PrP       | 18055,11 |
| BuP       | 22232,14 |
| BP        | 22205,23 |
| BPA       | 16849,13 |
| E         | 21734,37 |

#### ❖ **Factor de retención (k'):**

Valores de k' por debajo de 1 indican que el analito eluye rápidamente, no interaccionando adecuadamente con el relleno de la columna. Por ello, el intervalo óptimo de este factor se encuentra entre 1 y 10 [353]. La Tabla 4 - 6 muestra los valores obtenidos de k' para cada uno de los CDEs. Todos, con excepción del MeP, presentaron un factor de retención dentro del intervalo óptimo, por lo que se retienen correctamente en la columna bajo las condiciones de cromatografía empleadas.

Tabla 4 - 6. Factores de retención obtenidos para cada uno de los contaminantes.

| Compuesto | Factor de retención |
|-----------|---------------------|
| MeP       | 0,91                |
| PrP       | 2,23                |
| BuP       | 3,81                |
| BP        | 6,82                |
| BPA       | 2,01                |
| E         | 3,58                |

A la vista de estos resultados, el MeP no se retenía correctamente en la columna. Por este motivo, se desarrolló un segundo método cromatográfico específicamente para este compuesto. Para el resto de los compuestos (PrP, BuP, BP, BPA y E), el método 1 proporcionó una buena retención, separación y resolución de picos, por lo que fue el empleado para su cuantificación.

#### 4.1.1.2. Método 2

Con el fin de retener más tiempo en la columna el MeP, se redujo la cantidad de fase orgánica (acetonitrilo) para incrementar la polaridad de la fase móvil. Además, se optó por un método en gradiente (Tabla 4 - 7), para evitar que el resto de los compuestos quedaran retenidos en la columna y asegurar su correcta elución con la fase móvil, minimizando así el riesgo de interferencias en la cuantificación de muestras posteriores. Así, a los 4 minutos, una vez que el MeP había eluido, se incrementó la cantidad de fase orgánica para facilitar la elución de los demás compuestos. Por otro lado, se disminuyó la temperatura de la columna a 20°C, aumentando la viscosidad de la fase móvil, favoreciendo una mayor retención de este contaminante en la columna. El volumen de inyección de muestra fue de 10 µL, el caudal de fase móvil de 1,0 mL/min, y tanto las longitudes de onda como la columna empleada fueron las mismas que en el método 1.

Tabla 4 - 7. Método en gradiente para la detección de MeP.

| Tiempo (min) | ACN (%) | H <sub>2</sub> O (%) |
|--------------|---------|----------------------|
| 0,00         | 30,00   | 70,00                |
| 3,00         | 30,00   | 70,00                |
| 4,00         | 60,00   | 40,00                |
| 6,00         | 60,00   | 40,00                |
| 7,00         | 30,00   | 70,00                |
| 10,00        | 30,00   | 70,00                |

El cromatograma obtenido con este segundo método se presenta en la Figura 4 - 3. En él, se observa que la línea base es menos estable en comparación con un método isocrático, como ya se había mencionado anteriormente. Esta inestabilidad complica la cuantificación de los compuestos en la zona del gradiente, ya que la falta

de una línea base estable dificulta la integración de los picos. En este caso, el tiempo de retención para el MeP fue de 2,134 minutos.

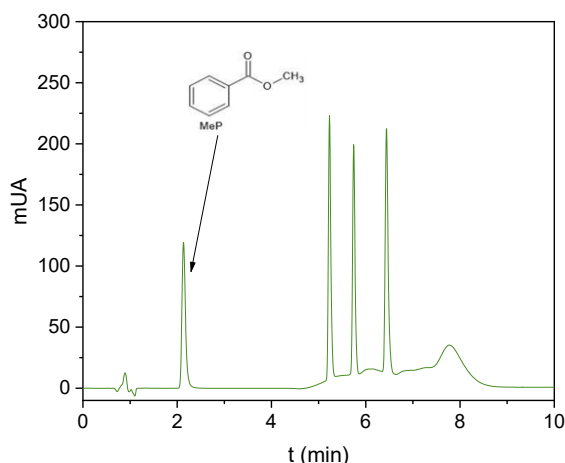


Figura 4 - 3. Cromatogramas de la mezcla de CDEs para MeP a 254 nm.

Se aplicaron los mismos parámetros para evaluar la idoneidad del sistema con este segundo método. Se obtuvo un factor de asimetría del pico de 1,25, dentro del rango aceptable. Las resoluciones respecto al pico inmediatamente anterior y posterior fueron 14,77 y 42,12, respectivamente, ambos valores superiores a 1,5. El número de platos teóricos fue de 11499,60. Finalmente, el factor de retención aumentó hasta 1,94, situándose dentro del rango óptimo de este parámetro, en comparación con el 0,91 obtenido con el método 1. Esto indicó que, con el método 2, el analito interactuó de manera más efectiva con la fase estacionaria.

#### 4.1.1.3. Validación de los métodos

Una vez estudiada la idoneidad del sistema, se llevó a cabo la validación de los dos métodos desarrollados mediante la estimación de la linealidad, la precisión y los límites de cuantificación (LOQ) y detección (LOD).

##### ❖ **Linealidad:**

La linealidad de los métodos desarrollados se evaluó para un intervalo de concentraciones de los CDEs entre 15 y 0,375 ppm, que se corresponde con el rango de trabajo de los experimentos posteriores. Para ello, se prepararon disoluciones patrón de la mezcla de CDEs en metanol con concentraciones de 15, 12, 9, 6,3, 3,3 y 0,375 ppm, y se analizaron tres veces cada una utilizando los métodos cromatográficos desarrollados. Como se puede observar en la Figura 4 - 4, todos los valores del coeficiente  $R^2$  fueron superiores de 0,99, por lo que ambos métodos presentan una adecuada linealidad en dicho rango de concentraciones.

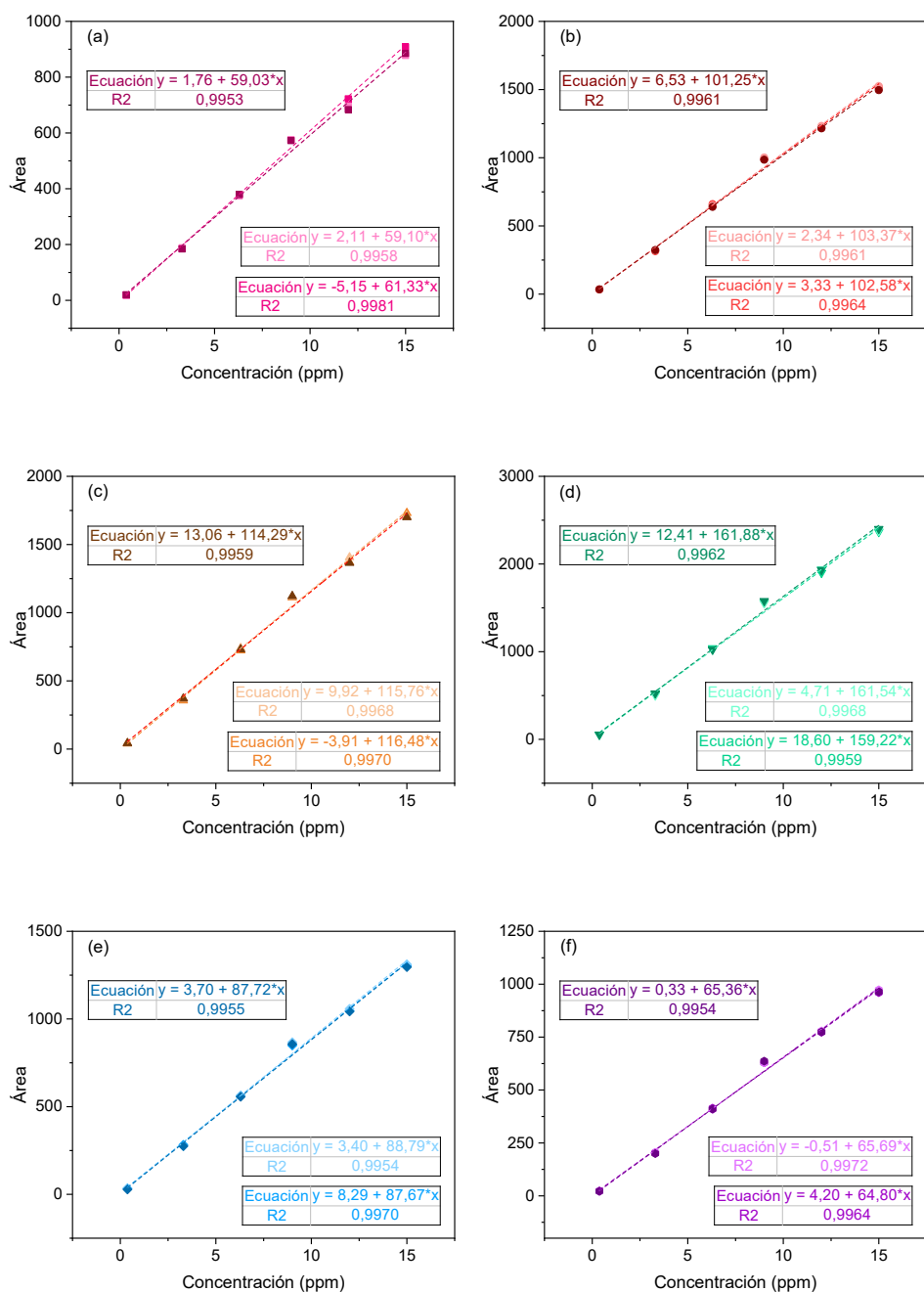


Figura 4 - 4. Estudio de la linealidad del método para (a) MeP, (b) PrP, (c) BuP, (d) BP, (e) BPA y (f) E.

❖ **Precisión:**

La precisión de los dos métodos se examinó analizando tres muestras de 10, 7 y 2 ppm preparadas en metanol y comparando los valores de concentración reales con los obtenidos mediante interpolación en las rectas de regresión. Estas rectas de regresión se obtuvieron de la representación del área frente a la concentración de la media de las tres áreas previamente obtenidas (Figura 4 - 4) y se presentan en la Tabla 4 - 8.

Tabla 4 - 8. Calibrados obtenidos para cada uno de los CDEs.

| Compuesto | Recta de regresión | R <sup>2</sup> |
|-----------|--------------------|----------------|
| MeP       | $y=59,82x-0,43$    | 0,9967         |
| PrP       | $y=102,40+4,07$    | 0,9962         |
| BuP       | $y=115,51+6,36$    | 0,9968         |
| BP        | $y=160,88+11,91$   | 0,9964         |
| BPA       | $y=88,06x+5,13$    | 0,9960         |
| E         | $y=62,29+1,38$     | 0,9964         |

Tabla 4 - 9. Estudio de precisión de los métodos de cromatografía para cada CDEs.

| Compuesto | Concentración real (ppm) | Concentración estimada (ppm) | Error (%) |
|-----------|--------------------------|------------------------------|-----------|
| MeP       | 10                       | 9,68                         | 3,22      |
|           | 7                        | 6,52                         | 6,79      |
|           | 2                        | 1,86                         | 6,82      |
| PrP       | 10                       | 9,72                         | 2,75      |
|           | 7                        | 6,66                         | 4,82      |
|           | 2                        | 1,92                         | 4,03      |
| BuP       | 10                       | 9,95                         | 0,45      |
|           | 7                        | 6,68                         | 4,61      |
|           | 2                        | 1,91                         | 4,47      |
| BP        | 10                       | 9,74                         | 2,61      |
|           | 7                        | 6,60                         | 5,74      |
|           | 2                        | 1,86                         | 6,84      |
| BPA       | 10                       | 9,98                         | 0,22      |
|           | 7                        | 6,77                         | 3,28      |
|           | 2                        | 1,97                         | 1,40      |
| E         | 10                       | 9,83                         | 1,70      |
|           | 7                        | 6,72                         | 4,06      |
|           | 2                        | 2,07                         | -3,55     |

El error cometido al interpolar el valor del área obtenido con cada una de las concentraciones respecto al valor de concentración real fue, en todos los casos, menor del 7%, como muestra la Tabla 4 - 9. Esto indicó que los valores de concentración determinados estaban muy cerca de los reales, lo que demuestra que con los métodos desarrollados se obtenían resultados precisos.

❖ **Límites de cuantificación y detección:**

Finalmente, se llevó a cabo la estimación de los LOQ y LOD de los compuestos y del límite de cuantificación instrumental (ILOQ), de acuerdo con el método detallado en la sección 0, cuyos valores aparecen en la Tabla 4 - 10.

*Tabla 4 - 10. Valores de ILOQ, LOQ y LOD obtenidos para los CDEs con HPLC-DAD.*

| <b>Compuesto</b> | <b>ILOQ (ppb)</b> | <b>LOQ (ppb)</b> | <b>LOD (ppb)</b> |
|------------------|-------------------|------------------|------------------|
| MeP              | 120               | 25               | 8                |
| PrP              | 110               | 33               | 10               |
| BuP              | 150               | 100              | 20               |
| BP               | 230               | 80               | 23               |
| BPA              | 110               | 70               | 8                |
| E                | 230               | 100              | 30               |

Para poder cuantificar posteriormente en un mayor rango de concentraciones los CDEs presentes en las muestras, se elaboraron calibrados entre el ILOQ y el LOQ obtenidos, empleando las alturas de pico. En la Figura 4 - 5 se muestran estos calibrados.

De este modo, ambos métodos cromatográficos quedaron validados para la cuantificación de la mezcla de CDEs. En resumen, para este propósito, se seleccionaron dos métodos basados en HPLC. Por un lado, el método 1 se empleó para cuantificar PrP, BuP, BP, BPA y E. La fase móvil utilizada fue una mezcla de acetonitrilo y agua (45:55), con un caudal de 0,5 mL/min. Como fase estacionaria, se seleccionó una columna con relleno C18. Las longitudes de onda fueron 254 nm para los parabenos y BP y 210 nm para BPA y E. La temperatura de la columna se ajustó a 35°C y el volumen de inyección de muestra fue de 10 µL. Por otro lado, el método 2 se utilizó exclusivamente para la cuantificación del MeP. En este caso, se optó por un método en gradiente, comenzado con una mezcla de la fase móvil de acetonitrilo y agua en una proporción de 30:70, que posteriormente se incrementó a 60:40. La temperatura de la columna se estableció en 20°C y el caudal de fase móvil en 1,0 mL/min. Las longitudes de onda, la columna y el volumen de inyección de muestra fueron los mismos que en el método 1.

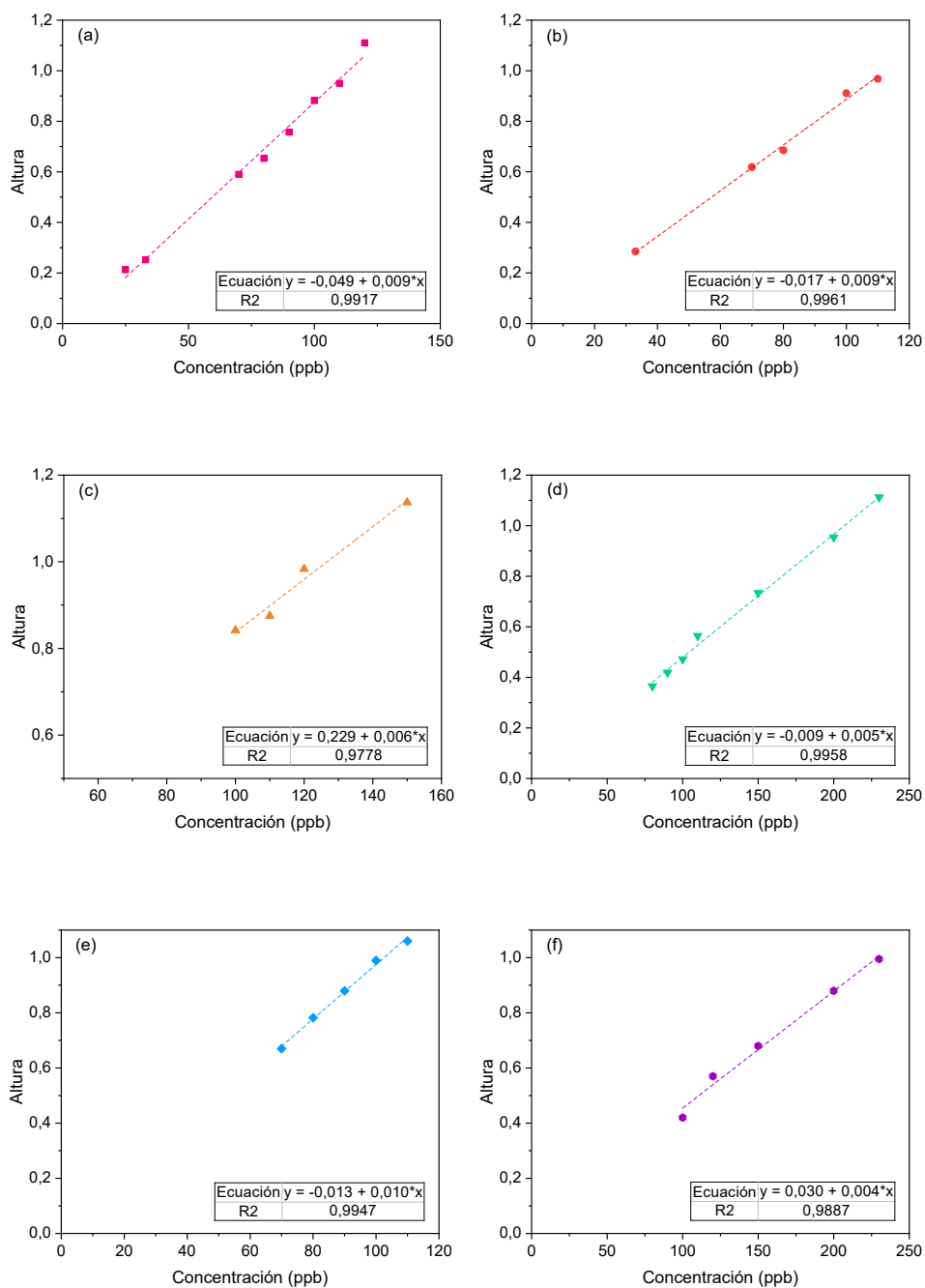


Figura 4 - 5. Calibrados de (a) MeP, (b) PrP, (c) BuP, (d) BP, (e) BPA y (f) E con las alturas de pico, entre el ILOQ y el LOQ.

### 4.1.2. Método de extracción en fase sólida

#### 4.1.2.1. Estudio de variables

Una vez establecido el método para cuantificar los CDEs mediante HPLC-DAD, se procedió al desarrollo de la técnica de extracción en fase sólida para preconcentrar los contaminantes. Como se explicó en detalle en la sección 1.2.2, los métodos basados en extracción en fase sólida dependen de múltiples variables, por lo que se llevó a cabo un estudio para evaluar su influencia en la recuperación de los diferentes CDEs. Concretamente, se analizó el volumen de muestra, la cantidad de adsorbente, el pH y el volumen de disolvente de elución (metanol). Los valores máximos y mínimos estudiados para cada una de estas variables se presentan en la Tabla 4 - 11. La concentración inicial de todas las muestras fue de 1 ppm de cada CDEs y se prepararon en agua residual sintética (ARS).

Tabla 4 - 11. Factores empleados en el estudio de variables y valores mínimos y máximos seleccionados.

| U <sub>i</sub> : Factores            | Unidades | Valor mínimo | Valor máximo |
|--------------------------------------|----------|--------------|--------------|
| U <sub>1</sub> : Volumen de muestra  | mL       | 10           | 100          |
| U <sub>2</sub> : Volumen de eluyente | mL       | 0,5          | 10           |
| U <sub>3</sub> : pH                  | -        | 2            | 7            |
| U <sub>4</sub> : Masa de adsorbente  | mg       | 50           | 500          |

De este modo, se obtuvieron un total de 16 experimentos con todas las posibles combinaciones de variables en sus valores máximos y mínimos, que aparecen en detalle en la Tabla 4 - 12.

La Figura 4 - 6 recoge las recuperaciones obtenidas con este estudio de variables. En general, las mayores recuperaciones se lograron con el cartucho de 500 mg de adsorbente (experimentos del 9 al 16). Comparando todas las recuperaciones alcanzadas con el cartucho de 50 mg y con el de 500 mg, se observó que con el primer relleno solo hay 12 por encima del 80% y 4 entre el 50 y el 80%. Sin embargo, con el relleno de 500 mg, un total de 23 recuperaciones estaban por encima del 80% y 16 entre el 50 y el 80%. Además, con el cartucho de 50 mg, había 7 recuperaciones del 0%, 6 de ellas pertenecientes al MeP y una a la E, siendo siempre superior al 0% en todas las recuperaciones para el cartucho de 500 mg.

Tabla 4 - 12. Plan experimental del estudio de variables.

| Número de experimento | U <sub>1</sub> | U <sub>2</sub> | U <sub>3</sub> | U <sub>4</sub> |
|-----------------------|----------------|----------------|----------------|----------------|
| 1                     | 10             | 0,5            | 2              | 50             |
| 2                     | 100            | 0,5            | 2              | 50             |
| 3                     | 10             | 10             | 2              | 50             |
| 4                     | 100            | 10             | 2              | 50             |
| 5                     | 10             | 0,5            | 7              | 50             |
| 6                     | 100            | 0,5            | 7              | 50             |
| 7                     | 10             | 10             | 7              | 50             |
| 8                     | 100            | 10             | 7              | 50             |
| 9                     | 10             | 0,5            | 2              | 500            |
| 10                    | 100            | 0,5            | 2              | 500            |
| 11                    | 10             | 10             | 2              | 500            |
| 12                    | 100            | 10             | 2              | 500            |
| 13                    | 10             | 0,5            | 7              | 500            |
| 14                    | 100            | 0,5            | 7              | 500            |
| 15                    | 10             | 10             | 7              | 500            |
| 16                    | 100            | 10             | 7              | 500            |

Además, en la Figura 4 - 6, se observa cómo el compuesto que mostró peores recuperaciones fue claramente el MeP, siendo menores del 60% en todos los casos, excepto para el experimento 15 que fue del 100,82%. Particularmente, para los experimentos con un cartucho de 50 mg este porcentaje fue especialmente bajo, del 0% para 6 de los 8 experimentos y aproximadamente del 10% en los 2 restantes. Con el empleo del cartucho de 500 mg estas recuperaciones mejoraron considerablemente, sobre todo para los experimentos en los que se cargaba el mínimo volumen de muestra (experimentos 9, 11, 13 y 15). Este comportamiento probablemente estaría relacionado con la solubilidad del MeP en agua. Así, según la Tabla 3 - 1, el MeP es el compuesto más soluble en agua de la mezcla de CDEs seleccionada. Por lo tanto, es posible que, a medida que se cargue más muestra acuosa en el cartucho, el MeP retenido tienda a eluirse nuevamente en la propia matriz, perdiéndose.

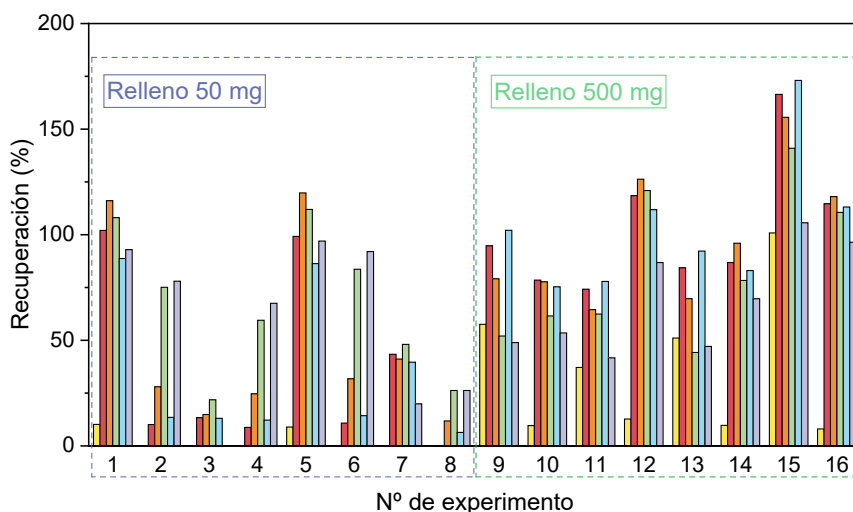


Figura 4 - 6. Recuperaciones (%) de MeP (amarillo), PrP (rojo), BuP (naranja), BP (verde), BPA (azul) y E (morado) para el estudio de variables.

Los experimentos que proporcionaron las recuperaciones más bajas fueron el 3 y el 8, justamente ambos con un cartucho de 50 mg de relleno. En el experimento 3, no se recuperó nada de MeP ni de E; de PrP y BPA solo se recuperó el 13%, de BuP el 15% y de BP el 22%. En el experimento 8, no se encontró nada de MeP ni PrP, recuperando únicamente el 12% de BuP, el 26% de BP y E, y el 6% de BPA. Finalmente, el experimento que dio los mejores resultados fue el número 15, que se corresponde con el empleo del mínimo volumen de muestra, el máximo volumen de elución, un pH de 7 y un relleno de 500 mg. Las recuperaciones así obtenidas fueron superiores al 100% para todos los compuestos.

Para evaluar el efecto del pH en las recuperaciones se compararon por pares los experimentos en los que todas las condiciones se mantuvieron constantes, excepto el pH. Se realizaron dos comparaciones, una con el cartucho de 50 mg (Figura 4 - 7 (a)) y otra con el de 500 mg (Figura 4 - 7(b)). En ambos casos, se observó un comportamiento similar con respecto al pH. En primer lugar, cuando el volumen de elución fue mínimo (0,5 mL), las diferencias en las recuperaciones entre a pH 2 y pH 7 fueron poco significativas. En los experimentos 1 y 5 y 2 y 6 (Figura 4 - 7 (a)), así como en los experimentos 9 y 13 y 10 y 14 (Figura 4 - 7 (b)), las variaciones fueron inferiores al 15% para el cartucho de 50 mg y menores al 23% para el de 500 mg. Estos resultados coinciden con los obtenidos por Vega-Morales et al. (2010), que tampoco encontraron diferencias en las recuperaciones de APEOs, BPA, NP, 17  $\alpha$ -etinilestradiol y 17  $\beta$ -estradiol al emplear un cartucho de 500 mg de relleno de C18 en un rango de pH de 3 y 9, utilizando 2 mL de metanol como disolvente de elución [354].

Sin embargo, cuando el volumen de elución aumentó a 10 mL, el pH sí que influyó en las recuperaciones de los contaminantes. Al comparar los experimentos 3 y 7 (Figura 4 - 7 (a)) y 11 y 15 (Figura 4 - 7 (b)), se observó que el pH 7 proporcionó las mejores recuperaciones cuando el volumen de muestra fue de 10 mL. En contraste, al analizar los experimentos 4 y 8 (Figura 4 - 7 (a)), con un volumen de muestra de 100 mL, el pH 2 favoreció las recuperaciones, excepto en el caso del MeP, cuya recuperación fue del 0% en ambos casos. Por otro lado, con el cartucho de 500 mg, la comparación entre los experimentos 12 y 16 no mostró una tendencia clara. Se observó un aumento del 36,7 % en la recuperación para MeP a pH 2 en comparación con pH 7, pero la diferencia en el resto de los compuestos fue prácticamente despreciable (entre el 1,1% y el 10%).

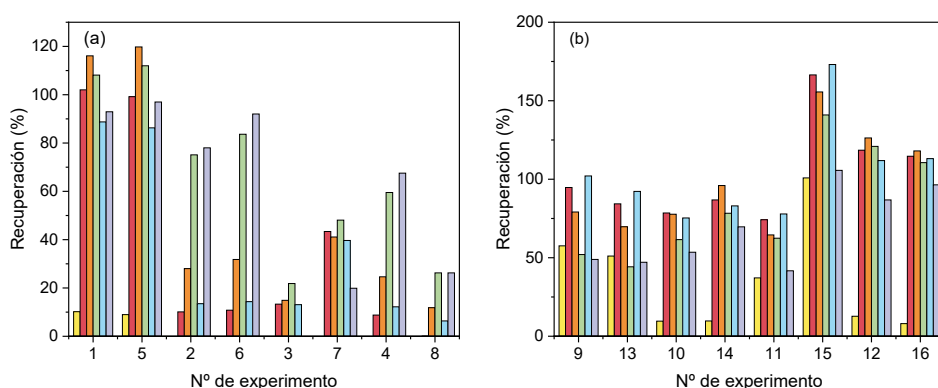


Figura 4 - 7. Recuperaciones (%) de MeP (amarillo), PrP (rojo), BuP (naranja), BP (verde), BPA (azul) y E (morado) para (a) el cartucho de 50 mg y (b) el cartucho de 500 mg. Efecto del pH.

En cuanto al volumen de elución, se identificaron dos tendencias diferentes en función de la cantidad de relleno utilizada. En la Figura 4 - 8 (a) se presenta la comparativa por pares de los experimentos con el cartucho de 50 mg, en los que únicamente varió el volumen de elución, manteniéndose constantes el resto de los parámetros. En general, se obtuvieron mejores recuperaciones al emplear la cantidad mínima de disolvente. Esta tendencia fue especialmente evidente al comparar los experimentos 1 y 3, 5 y 7 y 6 y 8, donde las recuperaciones fueron entre un 54% y un 99% superiores cuando se empleó 0,5 mL de eluyente en lugar de 10 mL, con excepción del MeP en el último par de experimentos. No obstante, el incremento de la recuperación fue menos marcado en la comparación entre los experimentos 2 y 4, con aumentos de entre 10% y 21% en los contaminantes del experimento 4 al 2. En este caso, la recuperación del MeP fue nuevamente del 0% en ambos experimentos. Por el contrario, con el cartucho de 500 mg, los mayores porcentajes de recuperación se obtuvieron con el máximo volumen de eluyente, salvo en la comparación entre los experimentos 9 y 11 (Figura 4 - 8 (b)). Entre los experimentos 10 y 12 y 13 y 15, esta tendencia es muy clara, ya que se observaron aumentos en las recuperaciones de entre un 24% y un 69% cuando el volumen de elución se incrementó de 0,5 mL a 10

mL. Por otro lado, aunque esta misma tendencia se identificó entre los experimentos 14 y 16 (excepto para MeP, cuya recuperación se mantuvo prácticamente constante), el aumento en la recuperación fue menor, situándose entre el 19% y el 29%. La influencia positiva del volumen de eluyente en la recuperación de ciertos compuestos ya ha sido indicada previamente en la bibliografía. Así, en el proceso de preconcentración de carbamatos, para aumentar su recuperación, se debería trabajar con un volumen de eluyente elevado [355].

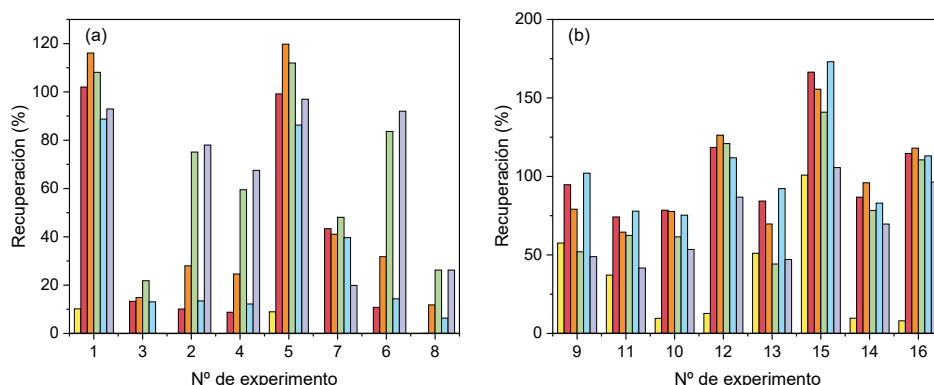


Figura 4 - 8. Recuperaciones (%) de MeP (amarillo), PrP (rojo), BuP (naranja), BP (verde), BPA (azul) y E (morado) para (a) el cartucho de 50 mg y (b) el cartucho de 500 mg. Efecto del volumen de elución.

La Figura 4 - 9 (a) muestra la comparación por pares de los experimentos en los que solo se varió el volumen de muestra entre 10 mL y 100 mL, manteniéndose el resto de las variables, utilizando el cartucho de 50 mg, mientras que la Figura 4 - 9 (b) presenta los resultados con el cartucho de 500 mg. Como puede observarse, no se identificó una tendencia general para todos los compuestos. Sin embargo, en la mayoría de los casos, las recuperaciones fueron más elevadas al emplear un menor volumen de muestra.

En el caso del MeP, se obtuvieron mayores recuperaciones con el cartucho de 50 mg y el menor volumen de muestra al comparar los experimentos 1 y 2, y 5 y 6 (Figura 4 - 9 (a)). Sin embargo, en los experimentos 3, 4, 7 y 8 la recuperación fue del 0% en todos los casos. Al emplearse el cartucho de 500 mg, la recuperación del MeP fue mayor cuando se empleó el volumen de muestra más bajo (Figura 4 - 9 (b)). El PrP presentó, en general mejores recuperaciones con un volumen de muestra de 10 mL en comparación con 100 mL. No obstante, en la comparación entre los experimentos 13 y 14, la recuperación fue similar en ambos volúmenes de muestra, mientras que en los experimentos 11 y 12, la recuperación fue mayor con 100 mL de muestra. En cuanto al BuP, no se identificó una tendencia clara. Se obtuvieron mejores recuperaciones con el menor volumen de muestra al compararse los experimentos 1 y 2, 5 y 6, 7 y 8 (Figura 4 - 9 (a)), y 15 y 16 (Figura 4 - 9 (b)). Sin embargo, en el resto de las comparaciones por pares, las recuperaciones fueron superiores con 100 mL de

muestra, salvo en la comparativa entre los experimentos 9 y 10 (Figura 4 - 9 (b)), donde no se encontraron diferencias significativas al variar el volumen de muestra. La BP mostró un comportamiento distinto según la cantidad de relleno. Con el cartucho de 50 mg, las mejores recuperaciones se obtuvieron con 10 mL de muestra si se comparan los experimentos 1 y 2, 5 y 6 y 7 y 8 (Figura 4 - 9 (b)), excepto en la comparación de los experimentos 3 y 4, donde la recuperación fue superior con 100 mL de muestra. En cambio, con el cartucho de 500 mg, la mayoría de las recuperaciones fueron mayores con el volumen de muestra más alto, excepto en la comparación entre los experimentos 15 y 16, donde la recuperación de BP fue mejor con el menor volumen de muestra. El BPA también mostró, en general, mejores recuperaciones con el menor volumen de muestra, excepto en la comparación entre los experimentos 11 y 12 (Figura 4 - 9(b)), donde el mayor volumen de muestra favoreció su recuperación.

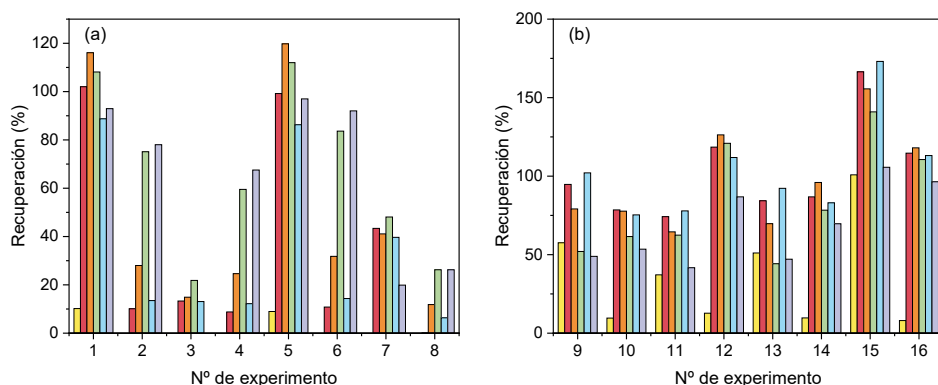


Figura 4 - 9. Recuperaciones (%) de MeP (amarillo), PrP (rojo), BuP (naranja), BP (verde), BPA (azul) y E (morado) para (a) el cartucho de 50 mg y (b) el cartucho de 500 mg. Efecto del volumen de muestra.

Finalmente, la E fue el compuesto cuya recuperación se vio más favorecida por los mayores volúmenes de muestra. Esto se observó en la comparación entre los experimentos 3 y 4, 7 y 8 (Figura 4 - 9 (a)), 11 y 12 y 13 y 14 (Figura 4 - 9(b)). Solo en la comparativa entre los experimentos 1 y 2 (Figura 4 - 9 (a)) se obtuvo una mayor recuperación con el menor volumen de muestra. En el resto de las comparaciones por pares las diferencias en la recuperación fueron mínimas al variar el volumen de muestra empleado.

De forma general, el hecho de que los bajos volúmenes de muestra favorezcan la recuperación de analitos se debe a que, durante la carga de muestra, el adsorbente retiene los analitos solo hasta alcanzar su punto de ruptura. El punto o volumen de ruptura se define como el volumen a partir del cual los compuestos de interés de una muestra, que se introduce de forma continua a través del dispositivo de extracción, comienzan a eluirse en la salida del sistema [169]. Una vez superado este punto, los analitos comienzan a eluirse junto con la matriz, lo que provoca su pérdida [355].

Una vez determinado el efecto de estas variables sobre la recuperación en los valores extremos, se llevaron a cabo 12 experimentos adicionales para evaluar su influencia en valores intermedios de volumen de muestra, pH y volumen de elución. La masa de adsorbente no pudo estudiarse en su valor medio ya que, al tratarse de cartuchos comerciales, no existía la posibilidad de ajustar esta variable. Por este motivo, se seleccionó directamente el cartucho de 500 mg, dado que fue el que mejores resultados había proporcionado (Figura 4 - 6).

Para ampliar el estudio de variables, en estos 12 experimentos adicionales se mantuvo una de las variables en su valor intermedio, mientras que las otras dos permanecieron en los valores extremos, tal y como se muestra en la Tabla 4 - 13.

Tabla 4 - 13. Plan experimental del estudio de variables. Valores intermedios

| Número de experimento | U <sub>1</sub> | U <sub>2</sub> | U <sub>3</sub> |
|-----------------------|----------------|----------------|----------------|
| 17                    | 100            | 10             | 4,5            |
| 18                    | 10             | 0,5            | 4,5            |
| 19                    | 100            | 0,5            | 4,5            |
| 20                    | 10             | 10             | 4,5            |
| 21                    | 55             | 10             | 7              |
| 22                    | 55             | 0,5            | 2              |
| 23                    | 55             | 10             | 2              |
| 24                    | 55             | 0,5            | 7              |
| 25                    | 100            | 5,25           | 7              |
| 26                    | 10             | 5,25           | 2              |
| 27                    | 100            | 5,25           | 2              |
| 28                    | 10             | 5,25           | 7              |

La Figura 4 - 10 presenta los resultados obtenidos del estudio de variables con valores intermedios. De acuerdo con los mismos, los experimentos 26 y 28 fueron los que proporcionaron las mejores recuperaciones, con valores superiores al 100% en todos los casos. En ambos experimentos se empleó un volumen de muestra de 10 mL y un volumen de elución intermedio, de 5,25 mL. Por el contrario, el experimento 23 presentó las peores recuperaciones, con valores inferiores al 20%. En este caso, se empleó un volumen de muestra intermedio de 55 mL, el volumen máximo de eluyente (10 mL) y un pH de 2.

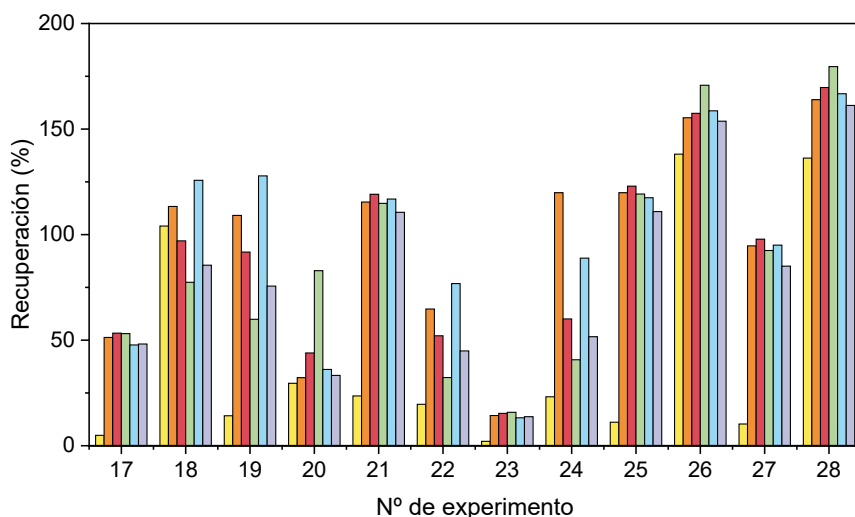


Figura 4 - 10. Recuperaciones (%) de MeP (amarillo), PrP (rojo), BuP (naranja), BP (verde), BPA (azul) y E (morado) para el estudio de variables con valores intermedios.

Para evaluar el efecto del pH intermedio (4,5) en la recuperación de los compuestos, se compraron los experimentos de tres en tres, manteniendo constantes el resto de las variables y variando únicamente el pH. Dichas comparativas aparecen en la Figura 4 - 11.

Cuando el volumen de eluyente fue de 10 mL (Figura 4 - 11 (a) y Figura 4 - 11 (d)), las recuperaciones fueron menores con pH 4,5, en comparación con pH de 2 y pH de 7. En particular, al analizar los experimentos 12, 17 y 16 (Figura 4 - 11 (a)), esta disminución en las recuperaciones se situó entre el 39% y el 61% para todos los compuestos. Por otro lado, en la comparación de los experimentos 11, 20 y 15 (Figura 4 - 11 (d)), la reducción en las recuperaciones fue más pronunciada respecto al experimento 15, que había mostrado las mejores recuperaciones, con disminuciones entre el 41% y el 81%. No obstante, en comparación con el experimento 11 a un valor de pH de 2, la reducción fue menos notable. De hecho, las recuperaciones para MeP y E fueron prácticamente iguales a pH de 2 y pH de 4,5 (de 37,2% y 29,6% para MeP y 41,7% y 33,3% para E en los experimentos 11 y 20, respectivamente) e incluso, en el caso de BP, la recuperación fue ligeramente superior (25%) con el pH intermedio respecto a pH de 2.

Previamente se había mencionado que, al emplear un volumen de elución de 0,5 mL, no se observaron grandes diferencias en las recuperaciones obtenidas para valores de pH 2 y 7, independientemente del volumen de muestra empleado. Sin embargo, al comparar entre sí los experimentos 9, 18 y 13 (Figura 4 - 11 (b)) y 10, 19 y

14 (Figura 4 - 11(c)), se encontró que, en estas condiciones, el pH de 4,5 mejoró, en general, las recuperaciones de todos los compuestos.

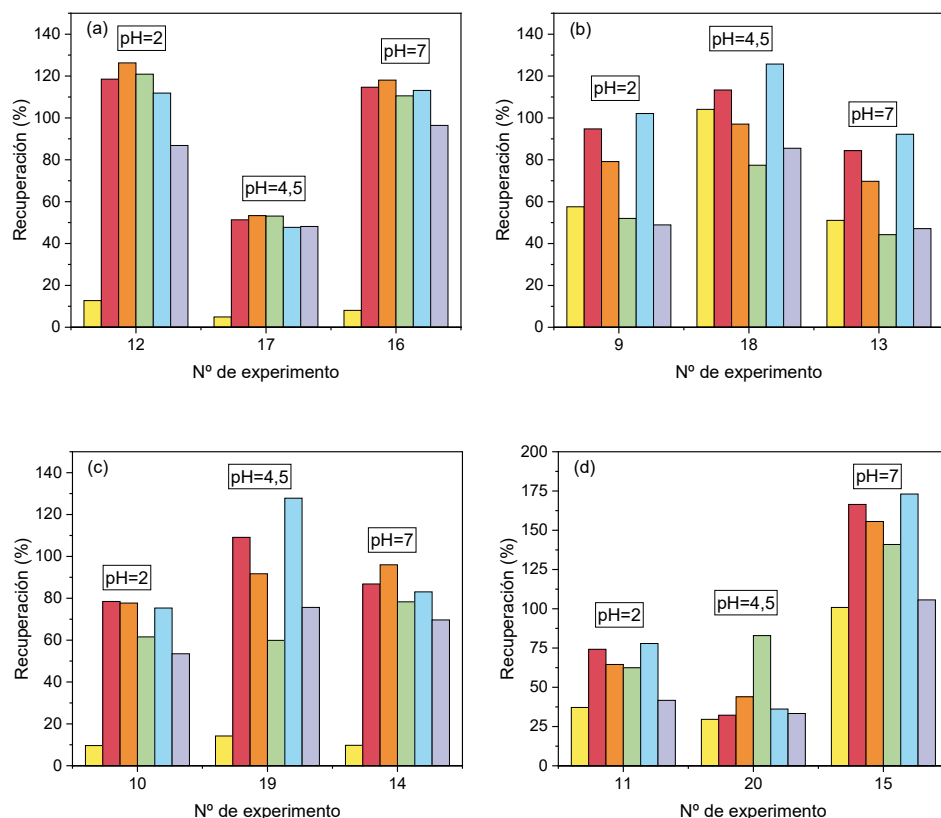


Figura 4 - 11. Recuperaciones (%) de MeP (amarillo), PrP (rojo), BuP (naranja), BP (verde), BPA (azul) y E (morado) para (a) volumen de muestra de 100 mL y volumen de elución de 10 mL, (b) volumen de muestra de 10 mL y volumen de elución de 0,5 mL, (c) volumen de muestra de 100 mL y volumen de elución de 0,5 mL y (d) volumen de muestra de 10 mL y volumen de elución de 10 mL. Efecto del pH intermedio.

En la Figura 4 - 12 se presenta la comparación de los experimentos en los que varía el volumen de elución entre 0,5 mL, 5,25 mL y 10 mL y se mantienen constantes el resto de las variables.

Previamente, se había observado que el volumen de elución de 10 mL favoreció, en general, la recuperación de los compuestos en comparación con el volumen de 0,5 mL. Sin embargo, al evaluar el efecto de un volumen de muestra intermedio de 5,25 mL, se identificaron diferentes tendencias dependiendo del resto de variables. En la Figura 4 - 12 (a) se muestra la comparación entre los experimentos 14, 25 y 16, que comparten un volumen de muestra de 100 mL y un pH de 7. Como puede observarse, el volumen de elución intermedio mejoró las recuperaciones en comparación con el volumen mínimo (experimento 14). Sin embargo, al comparar los experimentos 25 (5,25 mL) y 16 (10 mL), las recuperaciones fueron similares, lo que

indica que incrementar el volumen de eluyente hasta el máximo no aportó ninguna mejora. De hecho, en el caso de MeP, la recuperación aumentó un 28% con el volumen intermedio respecto al volumen máximo.

Como ya se comentó anteriormente, la comparativa entre los experimentos 9 y 11 no siguió la tendencia general de que un mayor volumen de elución proporciona mejores recuperaciones. Al incluir el estudio con un volumen de elución intermedio (Figura 4 - 12 (b)), se observó que las recuperaciones mejoraron para todos los compuestos al emplear 5,25 mL de eluyente, en comparación con los valores máximos y mínimos de esta variable.

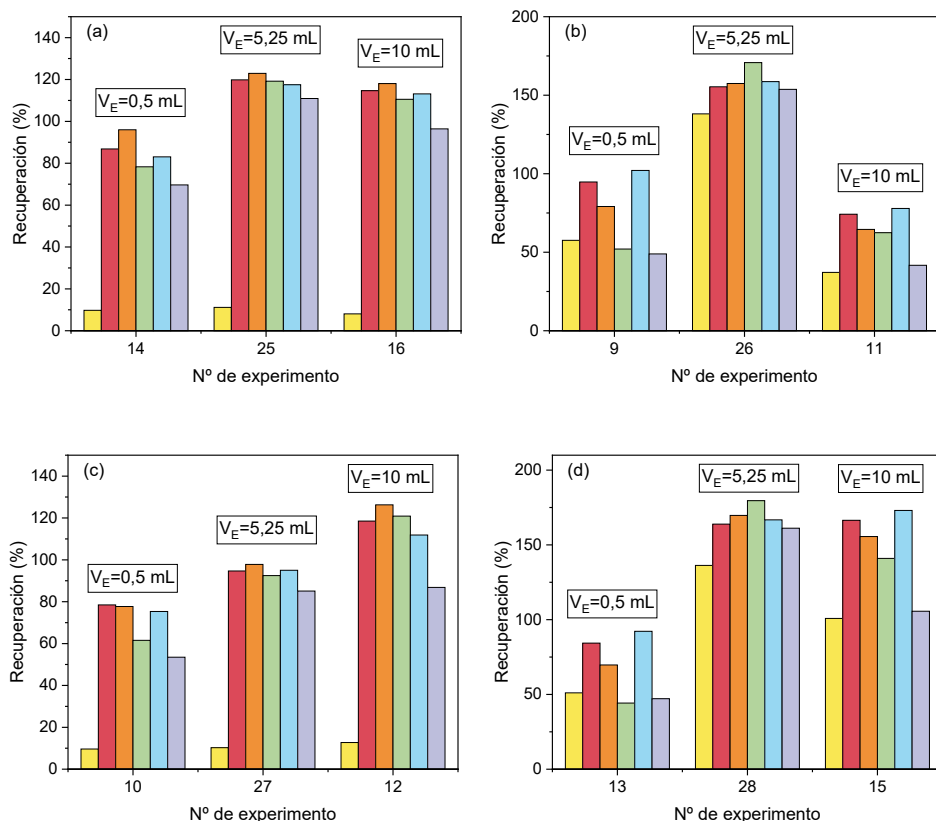


Figura 4 - 12. Recuperaciones (%) de MeP (amarillo), PrP (rojo), BuP (naranja), BP (verde), BPA (azul) y E (morado) para (a) volumen de muestra de 100 mL y pH de 7, (b) volumen de muestra de 10 mL y pH de 2, (c) volumen de muestra de 100 mL y pH de 2 y (d) volumen de muestra de 10 mL y pH de 7. Efecto del volumen de elución intermedio.

La Figura 4 - 12 (c), correspondiente a 100 mL de muestra y un valor de pH de 2, fue la única en la que se observó claramente la tendencia esperada, las recuperaciones aumentaron a medida que se incrementaba el volumen de elución. Las únicas excepciones fueron MeP, entre 0,5 mL y 5,25 mL, y E, entre 5,25 mL y 10 mL, donde no se encontraron diferencias en las recuperaciones.

Finalmente, en la Figura 4 - 12 (d), correspondiente a 10 mL de muestra y pH 7, se aprecia que, al aumentar el volumen de eluyente de 0,5 mL a 5,25 mL, las recuperaciones de todos los compuestos aumentaron. Sin embargo, al incrementar el volumen de elución de 5,25 mL a 10 mL, se encontraron aumentos solamente para MeP, BP y E, del 26%, 22% y 34%, respectivamente, mientras que en el resto de los compuestos las recuperaciones se mantuvieron prácticamente constantes.

Respecto al volumen de muestra intermedio, se realizaron comparaciones entre tres experimentos a la vez, manteniendo constantes el volumen de elución y el pH, que se presentan en la Figura 4 - 13. Cuando el volumen de elución fue de 10 mL y el pH de 7 (Figura 4 - 13 (a)) se observó que las recuperaciones de todos los compuestos disminuyeron al incrementar el volumen de muestra de 10 mL a 55 mL. Sin embargo, al aumentar el volumen de muestra de 55 mL a 100 mL, las recuperaciones no variaron, con excepción del MeP, cuya recuperación se redujo un 66%. En estas condiciones, la recuperación de E se mantuvo prácticamente constante, independientemente del volumen de muestra empleado. Por el contrario, al mantener el mismo volumen de elución (10 mL) pero reduciendo el pH a 2 (Figura 4 - 13 (c)), la tendencia fue completamente diferente. En este caso, las mejores recuperaciones se lograron con el mayor volumen de muestra (100 mL), excepto para MeP, y las peores recuperaciones se obtuvieron con el volumen de muestra intermedio (55 mL).

Cuando se utilizó un volumen de elución de 0,5 mL y un pH de 2 (Figura 4 - 13 (b)) se observó una disminución en la recuperación de todos los compuestos al aumentar el volumen de muestra de 10 mL a 55 mL. No obstante, al incrementar el volumen de muestra hasta 100 mL, la recuperación de MeP siguió disminuyendo, mientras que la de PrP, BuP y BP aumentó y BPA permaneció constante. Nuevamente, la recuperación de E fue prácticamente independiente del volumen de muestra en estas condiciones.

Por último, la comparación entre los experimentos 13, 24 y 14 (Figura 4 - 13 (d)) mostró una tendencia menos clara. Al aumentar el volumen de muestra de 10 mL a 55 mL, la recuperación de MeP y BuP disminuyó, mientras que la de PrP aumentó y la de BP y E se mantuvo prácticamente constante. Por otro lado, al comparar las recuperaciones obtenidas con el volumen intermedio (55 mL, experimento 24) y el volumen máximo (100 mL, experimento 14), se encontró una disminución en la recuperación de MeP y PrP, un aumento en BuP, BP y E. Además, en estas condiciones, la recuperación del BPA se mantuvo constante independientemente del volumen de muestra empleado.

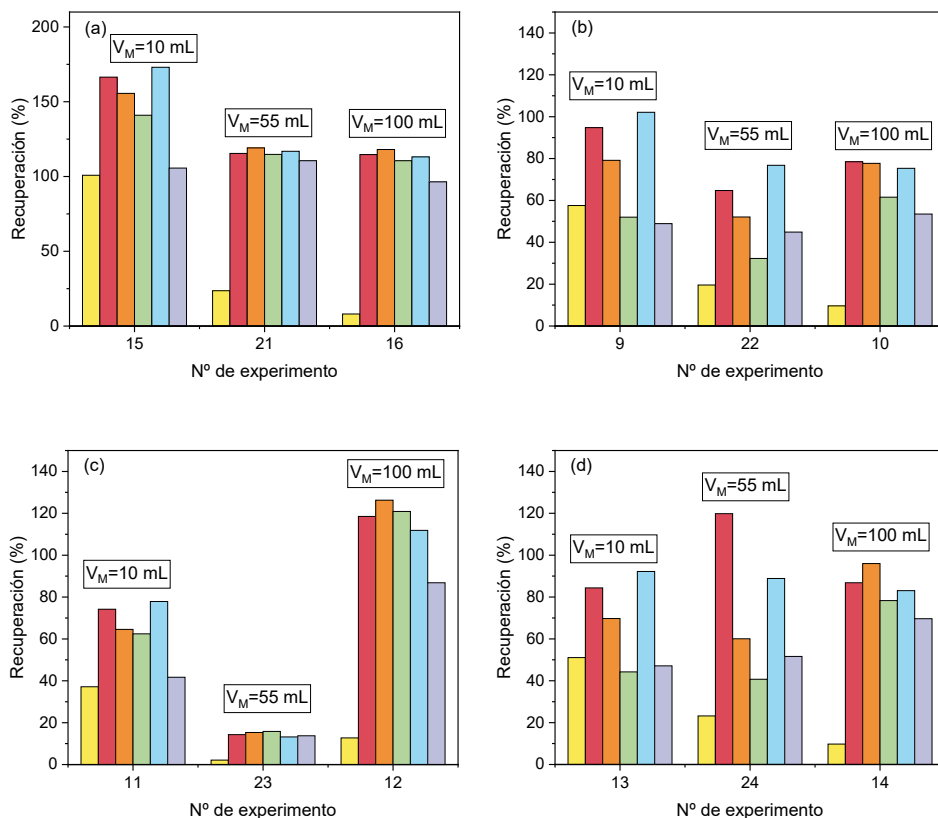


Figura 4 - 13. Recuperaciones (%) de MeP (amarillo), PrP (rojo), BuP (naranja), BP (verde), BPA (azul) y E (morado) para (a) volumen de elución de 10 mL y pH de 7, (b) volumen de elución de 0,5 mL y pH de 2, (c) volumen de elución de 10 mL y pH de 2 y (d) volumen de elución de 0,5 mL y pH de 7. Efecto del volumen de muestra intermedio.

De acuerdo con los resultados obtenidos, se obtuvieron las siguientes conclusiones:

- Respecto al pH, el valor óptimo varió según las condiciones. Con volúmenes bajos de elución (0,5 mL), un pH de 4,5 mejoró las recuperaciones. Sin embargo, al aumentar el volumen de eluyente a 10 mL, el pH de 7 resultó más favorable cuando el volumen de muestra era de 10 mL. Si este volumen se incrementaba a 100 mL, las recuperaciones fueron independientes del pH (entre pH de 2 y pH de 7).
- En general, las mayores recuperaciones se alcanzaron con el mayor volumen de elución (10 mL). No obstante, con 10 mL de muestra, un volumen intermedio de elución (5,25 mL) permitió mejorar las recuperaciones para la mayoría de los compuestos.
- En cuanto al volumen de muestra, su efecto dependió del compuesto analizado: MeP, BPA y, en parte, PrP mostraron mejores recuperaciones con

volúmenes bajos de muestra (10 mL). En cambio, BuP y BP alcanzaron mayores recuperaciones con volúmenes de muestra elevados (100 mL). En el caso de E, no se observó una tendencia clara, en algunos experimentos la recuperación fue independiente del volumen de muestra, mientras que en otros mejoró con 100 mL.

#### 4.1.2.2. Selección de variables

Una vez analizados los resultados del estudio de variables y extraídas las conclusiones, se procedió a seleccionar los valores de las variables estudiadas. Tal y como se mostró anteriormente, los experimentos 15, 26 y 28 fueron los que mostraron recuperaciones de CDEs más elevadas. Sin embargo, para determinar adecuadamente los valores de las diferentes variables, no solo se debían considerar las condiciones que proporcionaban las mejores recuperaciones, sino también las limitaciones experimentales a escala de laboratorio. Además, el objetivo principal del pretratamiento es preconcentrar las muestras en los analitos de interés antes de ser analizadas por HPLC. Por este motivo, también fue importante tener en cuenta la relación entre el volumen de muestra y el volumen de eluyente, es decir, el factor de concentración (FC) resultante. Teniendo en cuenta todos estos aspectos se procedió a seleccionar los valores de las variables comentadas anteriormente.

En cuanto a la masa de adsorbente, se seleccionó el **cartucho de 500 mg de relleno**, ya que proporcionó, en general, las mejores recuperaciones para todas las condiciones.

Analizando el valor del FC en los experimentos que mostraron mejores recuperaciones (15, 26 y 28), se observó que los valores obtenidos fueron de 1 o, como máximo, 1,9, valores muy por debajo de los rangos típicos de FC en este tipo de procesos de pretratamiento de las muestras, que suelen situarse entre 25 y 100 cuando se dispone de un alto volumen de muestra [166,356,357], y ligeramente menores cuando el volumen de muestra es más bajo [358].

Estos resultados indicaban que era necesario emplear un volumen de muestra superior a 10 mL para conseguir un FC más alto y poder cuantificar concentraciones más bajas de los CDEs. Para ello se comparó el experimento 15 (10 mL de muestra) con los experimentos 21 (55 mL de muestra) y 16 (100 mL de muestra) (Figura 4 - 13 (a)), observándose una disminución entre del 20-30% en la recuperación de todos los compuestos al aumentar el volumen de muestra de 10 mL a 55 mL, lo que supuso una pérdida aceptable para este tipo de análisis. Además, al comparar los resultados a 55 mL y 100 mL, las recuperaciones se mantuvieron constantes, lo que sugiere que aumentar el volumen de muestra no afectaría significativamente la recuperación de los CDEs. Incluso, en el caso de la E, su recuperación se mantuvo constante independientemente del volumen de muestra. Sin embargo, la recuperación de MeP sí mostró una gran dependencia del volumen de muestra, con una disminución del 77% entre 10 mL y 55 mL y del 66% entre 55 mL y 100 mL. Este comportamiento es

frecuente en mezclas de compuestos heterogéneos, donde las condiciones óptimas para la recuperación de ciertos compuestos no favorecen a otros, especialmente cuando se trata de familias diferentes de CDEs [359].

Teniendo en cuenta que el volumen de muestra real disponible en los experimentos a escala de laboratorio era de 30 mL por día (sección 3.3.3.1), no fue posible desarrollar dos métodos diferentes para optimizar la recuperación de todos los compuestos. Además, esta limitación condicionó el aumento del volumen de muestra para maximizar el FC. Por lo tanto, se seleccionó un **volumen de muestra de 30 mL**, buscando maximizar todo lo posible el FC dentro de las limitaciones experimentales.

En cuanto al pH, anteriormente se había observado que valores de pH intermedios (4,5) solo mejoraban la recuperación de CDEs cuando se empleaba el volumen de muestra mínimo (0,5 mL). En la Figura 4 - 14 se presenta una comparación dos a dos entre los experimentos a pH de 4,5, en los que se mantenía tanto el pH como el volumen de muestra constante y se comparaba en función de los volúmenes de elución, donde se puede observar esta tendencia, los experimentos 18 y 19 con un volumen de elución de 0,5 mL presentaron mayores recuperaciones respecto a los experimentos 17 y 20, donde se emplearon 10 mL de volumen de elución. Al aumentar el volumen de elución, se registraron disminuciones de la recuperación entre 36-72% para todos los compuestos, excepto para BP, cuya recuperación a pH de 4,5 no se vio tan afectada por el volumen de elución empleado. Sin embargo, se iba a descartar trabajar con un volumen de elución de 0,5 mL, ya que como se había visto, aportaba los peores resultados de recuperación, por lo que también se descartó el pH de 4,5.

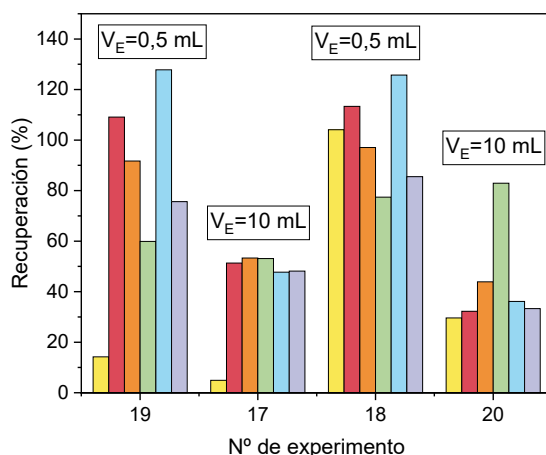


Figura 4 - 14. Recuperaciones (%) de MeP (amarillo), PrP (rojo), BuP (naranja), BP (verde), BPA (azul) y E (morado) para valores de pH de 4,5.

Al aumentar el volumen de elución a 5,25 mL o 10 mL, el **pH de 7** fue, en general, el que proporcionó mejores recuperaciones. Tanto en los experimentos con valores extremos del volumen de muestra y de elución como en los intermedios, el pH de 7 mostró mejores recuperaciones en la mayoría de las combinaciones (comparando los experimentos 11 y 15, 21 y 23 y 25 y 27). Aunque en algunos casos las diferencias entre pH de 2 y pH de 7 fueron mínimas (comparando por pares los experimentos 12 y 16 y 26 y 28), los resultados globales indicaron que el pH de 7 favoreció la recuperación de los compuestos cuando el volumen de eluyente era superior a 0,5 mL. Por ello, este valor fue seleccionado para llevar a cabo la SPE.

En cuanto al volumen de eluyente, en la Figura 4 - 12 quedó reflejado que se debería optar por un volumen de eluyente de 5,25 mL o 10 mL, ya que fueron las condiciones donde se obtuvieron mejores recuperaciones. Sin embargo, estos volúmenes de elución presentaban una limitación en el FC, obteniéndose un valor para el mismo de 5,7 y de 3, respectivamente. Por ello, se evaluó como solución la posibilidad de evaporar el disolvente y resuspender los contaminantes en 1 mL de metanol, logrando así un FC de 30. Esta técnica es muy empleada en procesos de SPE para aumentar la preconcentración de las muestras [168,358,360]. Para ello, se evaluaron dos métodos para evaporar el disolvente: el uso de un rotavapor y la evaporación con una corriente de nitrógeno.

#### ❖ **Evaporación del disolvente en un rotavapor:**

Se prepararon tres disoluciones en ARS de 30 mL con una concentración inicial de 100 ppb de cada contaminante. Estas muestras se extrajeron y eluyeron con 10 mL de metanol. Posteriormente, el disolvente se evaporó en un rotavapor y los analitos se resuspendieron en 1 mL de metanol, alcanzando un FC de 30. Las recuperaciones obtenidas se muestran en la Figura 4 - 15. Como puede observarse, solo se lograron recuperaciones del 100% o cercanas para BPA y E, mientras que para el resto de los compuestos fueron menores, aproximadamente del 72% para BuP, 61% para PrP y 18% para MeP.

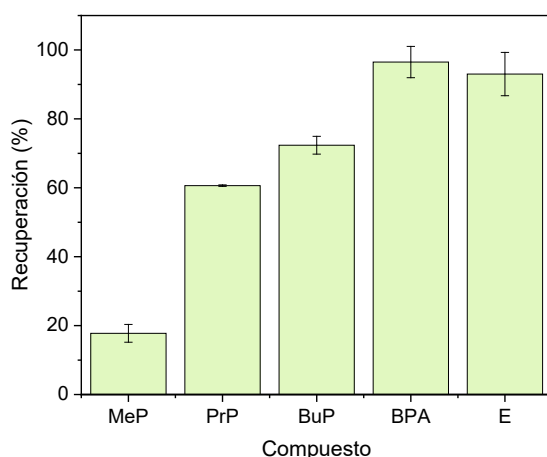


Figura 4 - 15. Recuperaciones (%) obtenidas con el método de extracción en fase sólida seguido de la evaporación del disolvente en un rotavapor. Las barras de error representan la  $\pm$  desviación estándar de la media ( $n=3$ ).

Además, no se detectó BP en las muestras, como se puede observar en el cromatograma que se presenta en la en la Figura 4 - 16, donde no se observa ningún pico en el tiempo de retención de BP (aproximadamente 10,2 min). Esto probablemente se debió a que su punto de fusión (Tabla 3 - 1) está por debajo del punto de ebullición del metanol, lo que pudo haber causado su arrastre con el vapor del disolvente o algún cambio en la estructura de la molécula. Por ello, se descartó este método.

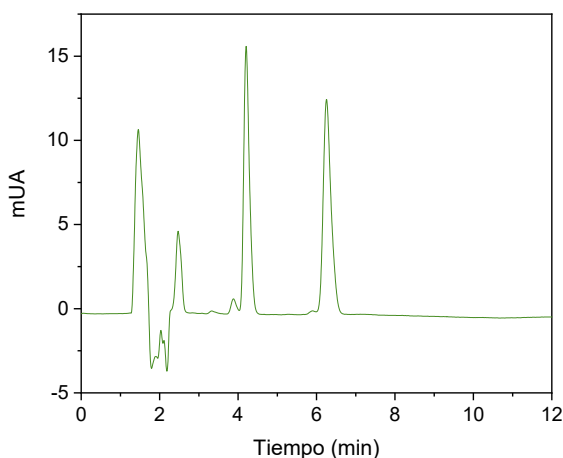


Figura 4 - 16. Cromatograma de la mezcla de CDEs tras la evaporación del disolvente en un rotavapor. Longitud de onda de detección: 254 nm.

### ❖ **Evaporación del disolvente con una corriente de nitrógeno:**

De manera similar, se prepararon tres disoluciones en ARS de 100 ppb de concentración inicial de cada contaminante. Las muestras fueron sometidas al mismo proceso previo, pero en este caso el disolvente se evaporó con una corriente de nitrógeno. Como se puede observar en la Figura 4 - 17, se lograron recuperaciones más elevadas para MeP, PrP y E, del 81%, 85% y 109% respectivamente, en comparación con el uso de un rotavapor (Figura 4 - 15). Estas mejoras fueron significativas, especialmente para MeP, cuya recuperación fue 4,5 veces mayor con este método respecto al anterior. Sin embargo, las recuperaciones de BuP y BPA fueron similares, alcanzando valores del 73% y 91%, respectivamente.

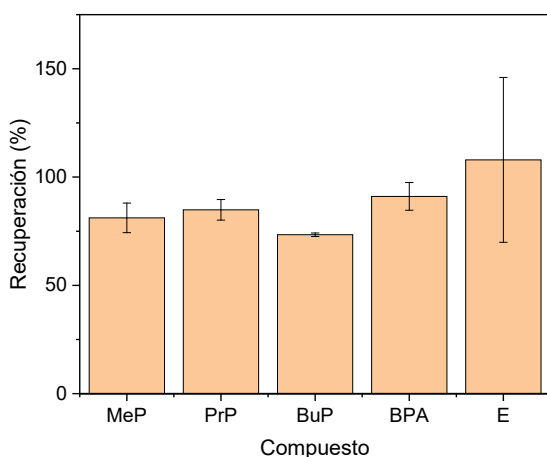


Figura 4 - 17. Recuperaciones (%) obtenidas con el método de extracción en fase sólida seguido de la evaporación del disolvente con una corriente de nitrógeno. Las barras de error representan la  $\pm$  desviación estándar de la media ( $n=3$ ).

A pesar de que los resultados con esta forma de evaporar el disolvente fueron mejores que en el caso de emplear un rotavapor, solo se detectó BP en una de las tres muestras, tal y como se muestra en la Figura 4 - 18. Como puede observarse, hay una elevación muy ancha alrededor del tiempo de retención correspondiente a BP (aproximadamente 10,2 min), lo que sugiere que probablemente se trate de dicho compuesto junto con productos de degradación. Por lo tanto, este método tampoco resultó adecuado para evaporar el disolvente.

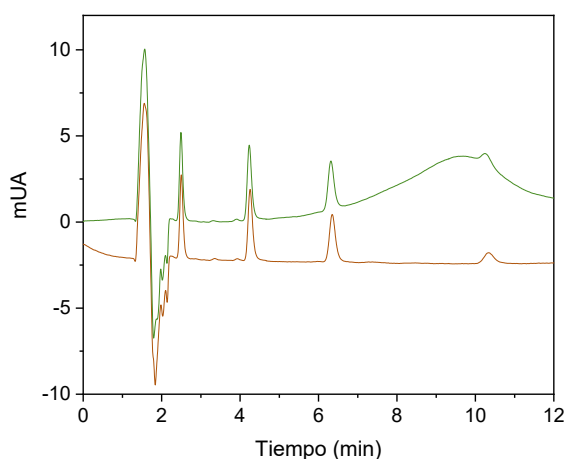


Figura 4 - 18. Cromatogramas a 254 nm de la mezcla de CDEs tras la evaporación del disolvente en un evaporador en réplica en la que se observa BP (marrón) y en una réplica en la que no se observa BP (verde).

Debido a la imposibilidad de recuperar BP tras la evaporación del disolvente, se descartó la opción de eluir en 10 mL de metanol y evaporarlo posteriormente. Ante esta limitación, se planteó la posibilidad de reducir el volumen de elución sacrificando parte de la recuperación con el objetivo de aumentar el FC. Para comprobar esta alternativa, se evaluó la recuperación de tres muestras de 30 mL, preparadas en ARS con una concentración inicial de 1 ppm de cada contaminante, y se procedió a la elución con un volumen de 2 mL, resultando un FC final de 15. Los resultados de recuperación obtenidos bajo estas condiciones se presentan en la Tabla 4 - 14. Excepto en el caso de MeP, cuya recuperación fue de aproximadamente 40%, el resto de los compuestos presentaron recuperaciones superiores al 100%, lo que indica que el empleo de un **volumen de elución de 2 mL** es viable.

Tabla 4 - 14. Recuperaciones (%) obtenidas para las muestras de 1 ppm con 30 mL de muestra, pH 7 y 2 mL de volumen de elución. Los errores representan la  $\pm$  desviación estándar de la media ( $n=3$ ).

| Compuesto | Recuperación (%) |
|-----------|------------------|
| MeP       | 39,3 $\pm$ 2,2   |
| PrP       | 144,2 $\pm$ 43,7 |
| BuP       | 121,9 $\pm$ 12,1 |
| BP        | 108,6 $\pm$ 13,1 |
| BPA       | 122,2 $\pm$ 12,6 |
| E         | 150,7 $\pm$ 18,6 |

Respecto a la baja recuperación de MeP, como se comentó previamente, trabajar con mezclas de CDEs presenta una complejidad añadida, ya que resulta difícil alcanzar condiciones óptimas de extracción para todos los compuestos simultáneamente, especialmente cuando estos presentan propiedades

fisicoquímicas distintas. Por este motivo, es frecuente que se deba sacrificar parte de la recuperación de algunos analitos. Por ejemplo, Liu et al. (2004) desarrollaron un método SPE para la detección simultánea de E, 17 $\beta$ -estradiol, 17 $\alpha$ -etinilestradiol, 16 $\alpha$ -hidroxiestrone, 4-nonilfenol, BPA y 4-terc-octilfenol, seguido de un análisis por GC-MS. Aunque la mayoría de los compuestos mostraron recuperaciones entre el 82,8% y el 116% a una concentración de 50 ng/L, el 4-nonilfenol presentó una recuperación más baja (64,1%) [361]. De forma similar, Goeury et al. (2022) evaluaron un método de SPE acoplado a UHPLC-MS/MS para la detección de 14 hormonas esteroideas y BPA en diversas matrices acuáticas. En este estudio se obtuvieron recuperaciones superiores al 80% para la mayoría de los analitos, a excepción del altrenogest, cuya recuperación osciló entre 40 y 60%, dependiendo de la matriz [166].

De este modo, teniendo en cuenta tanto los resultados obtenidos como las limitaciones técnicas y analíticas, se seleccionaron como condiciones finales del método de SPE: **500 mg de masa de adsorbente, 30 mL de volumen de muestra, pH 7 y 2 mL de volumen de elución.**

#### 4.1.2.3. *Evaluación del método desarrollado*

Una vez seleccionadas las condiciones de análisis que afectan a la extracción en fase sólida, se evaluó la idoneidad del método desarrollado, estudiando el punto de ruptura del cartucho y la linealidad y reproducibilidad del método.

##### ❖ Punto de ruptura:

Como se mencionó anteriormente, el punto de ruptura se define como el momento en el que, ya sea por emplear un volumen de muestra elevado o debido a una alta concentración de contaminantes, el material adsorbente del cartucho de SPE alcanza su capacidad de saturación, provocando que los analitos comiencen a eluirse sin ser retenidos. Es fundamental no superar este punto, ya que ello implicaría una pérdida de los analitos de interés, lo que se traduciría en una disminución de su recuperación y, en última instancia, en errores en la cuantificación de sus concentraciones.

Por este motivo, se verificó que, dentro del rango de trabajo de 1 ppm a 25 ppb, no se alcanzaba el punto de ruptura, evitando así que la pérdida de contaminantes debido a la saturación del relleno del cartucho. Para confirmarlo, se extrajeron cuatro disoluciones de baja concentración de cada contaminante (200, 150, 80 y 25 ppb) preparadas en ARS, comparándose las recuperaciones de cada contaminante con las obtenidas empleando la concentración máxima de trabajo (1 ppm), mostradas en la Tabla 4 - 14. En la Figura 4 - 19 se presentan estos resultados.

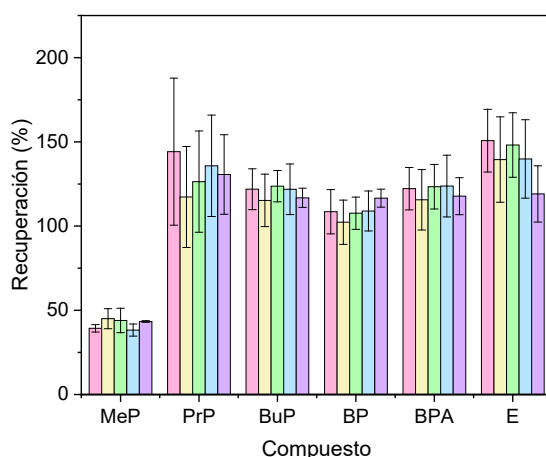


Figura 4 - 19. Recuperaciones (%) obtenidas para las disoluciones de 1 ppm (rosa), 200 ppb (amarillo), 150 ppb (verde), 80 ppb (azul) y 25 ppb (morado). Las barras de error representan la  $\pm$  desviación estándar de la media ( $n=3$ ).

Se realizó un análisis estadístico ANOVA, el cual mostró un valor de  $p>0,05$  al comparar las medias de las recuperaciones obtenidas para cada contaminante. Este resultado indicó que no se superó el punto de ruptura dentro del intervalo de concentraciones evaluado, ya que no se observaron pérdidas significativas de recuperación entre las muestras con concentraciones comprendidas entre 25 ppb y 1 ppm (menos del 10%).

#### ❖ **Linealidad y reproducibilidad:**

Para evaluar la reproducibilidad del método de extracción en fase sólida, se realizaron extracciones de tres calibrados distintos con una diferencia de 1 día entre ellos, para cada uno de los contaminantes estudiados. Para ello se prepararon seis disoluciones en ARS con concentraciones de 1, 0,8, 0,6, 0,42, 0,22 y 0,025 ppm de cada uno de los CDEs, que, tras ser preconcentradas, alcanzaron concentraciones de 15, 12, 9, 6,3, 3,3 y 0,375 ppm. Los resultados de los tres calibrados, junto con sus ajustes lineales, se presentan en la Figura 4 - 20. Estos resultados mostraron ajustes lineales con valores de  $R^2$  superiores a 0,99 para PrP, BuP, BP, BPA y E, y muy cercanos (0,98) para MeP.

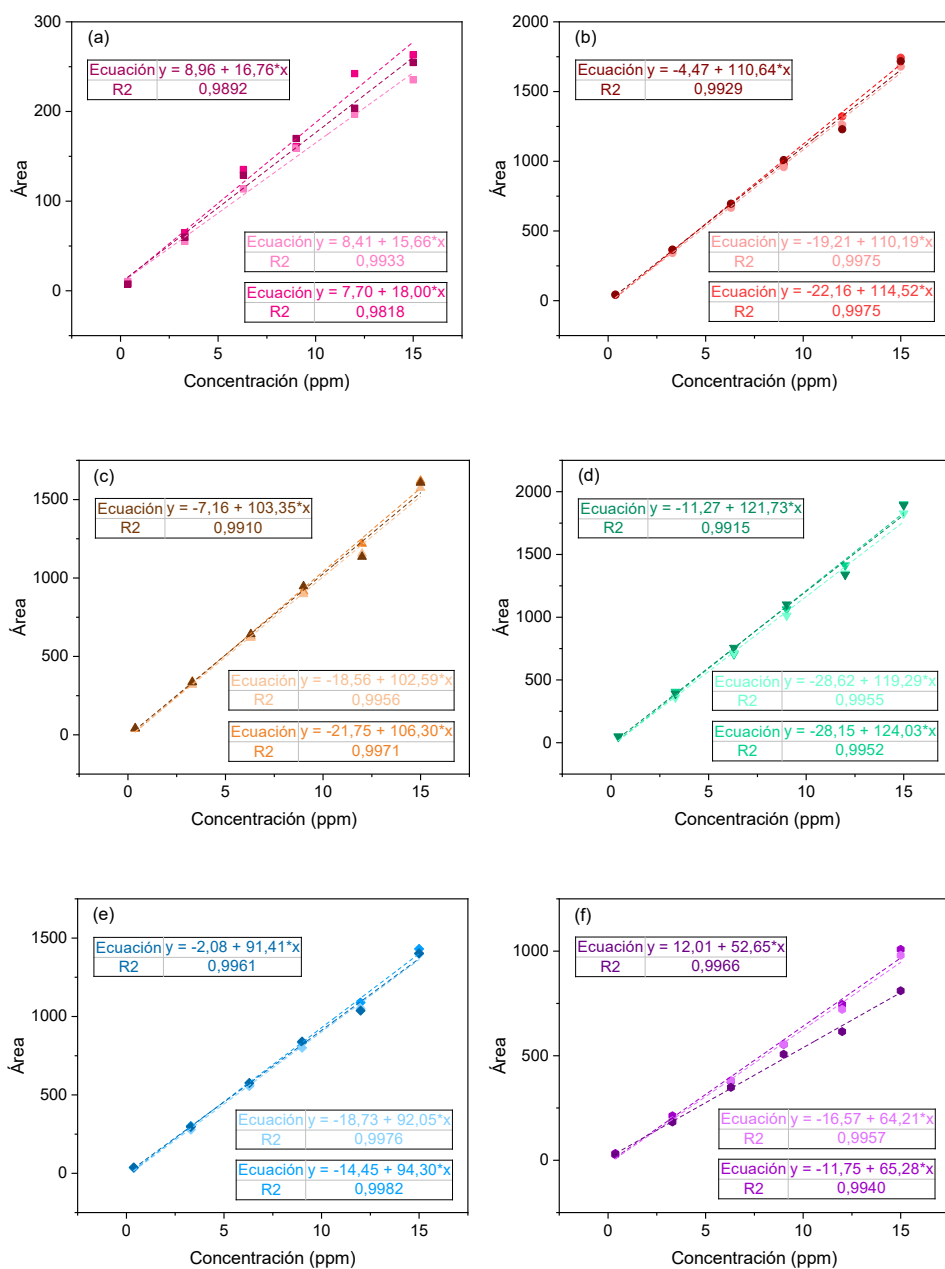


Figura 4 - 20. Calibrados tras la extracción en fase sólida para (a) MeP, (b) PrP, (c) BuP, (d) BP, (e) BPA y (f) E.

Para asegurar la consistencia en la interpolación de las muestras reales preconcentradas, los calibrados utilizados también serán previamente extraídos.

### 4.1.3. Ensayos con muestras reales

Por último, se realizaron ensayos con muestras reales en presencia de microalgas y empleando agua residual real, para determinar cómo afectaban estos factores a la recuperación de los contaminantes seleccionados.

El método de SPE desarrollado, combinado con los métodos cromatográficos por HPLC, se aplicó a los experimentos destinados a evaluar la degradación de la mezcla de CDEs bajo diferentes condiciones experimentales. Estas incluían factores abióticos como la luz (L), la aireación (O) o la combinación de ambos (LO), así como la presencia de microalgas en combinación con luz y aireación (LOM). No obstante, en los experimentos LOM, la presencia de biomasa microalgal podía representar una posible fuente de interferencia en la SPE al saturar el relleno de los cartuchos empleados, ya que, incluso tras la centrifugación y separación del sobrenadante de los pellets, parte de la biomasa quedaba en suspensión en la fracción acuosa. Debido a la complejidad de estas muestras (experimentos LOM), fue necesario aplicar un tratamiento previo al procedimiento de SPE, que consistió en su filtrado a través de membranas de 0,45 µm para eliminar cualquier sólido que pudiera obstruir el material adsorbente del cartucho. Además, con el fin de mantener la homogeneidad en el tratamiento de las muestras, también se aplicó el mismo filtrado (0,45 µm) a los experimentos abióticos (L, O y LO). Sin embargo, este paso podría conllevar una pérdida parcial de los contaminantes debido a su posible retención en el filtro. Por este motivo, se llevó a cabo un estudio para evaluar el efecto del filtrado sobre la recuperación de los analitos. Para ello, se prepararon tres réplicas de acuerdo con los experimentos LO (como ejemplo de muestras en condiciones abióticas) y tres réplicas de los experimentos LOM con *Scenedesmus* sp., todas ellas dopadas con 1 ppm de cada contaminante y preparadas en ARS. Las muestras LO fueron únicamente filtradas a 0,45 µm antes del proceso de SPE, mientras que las muestras LOM fueron centrifugadas, filtradas y, posteriormente, preconcentradas mediante SPE. Tras la extracción, todas las muestras fueron analizadas por HPLC siguiendo los métodos cromatográficos desarrollados. Los resultados de las concentraciones obtenidas se presentan en la Tabla 4 - 15.

Tabla 4 - 15. Concentraciones obtenidas para las muestras LO y LOM. Los errores representan la  $\pm$  desviación estándar de la media ( $n=3$ ).

| Compuesto | Concentración inicial (ppm) | Concentración muestras LO (ppm) | Concentración muestras LOM (ppm) |
|-----------|-----------------------------|---------------------------------|----------------------------------|
| MeP       | 1,00                        | 0,97 $\pm$ 0,02                 | 0,71 $\pm$ 0,08                  |
| PrP       | 1,00                        | 1,00 $\pm$ 0,01                 | 0,78 $\pm$ 0,02                  |
| BuP       | 1,00                        | 1,00 $\pm$ 0,01                 | 0,65 $\pm$ 0,02                  |
| BP        | 1,00                        | 1,00 $\pm$ 0,01                 | 0,83 $\pm$ 0,02                  |
| BPA       | 1,00                        | 1,02 $\pm$ 0,01                 | 0,27 $\pm$ 0,01                  |
| E         | 1,00                        | 0,91 $\pm$ 0,01                 | 0,26 $\pm$ 0,03                  |

Las concentraciones obtenidas en las muestras bajo condiciones abióticas (experimentos LO) fueron prácticamente iguales a la concentración inicial real (1 ppm), con recuperaciones comprendidas entre el 96,7% y el 101,5%. Esto indica que el filtrado previo a la SPE no afectó negativamente a la cuantificación de los compuestos en estas condiciones. Sin embargo, al incorporar microalgas en los experimentos LOM, se observaron concentraciones experimentales inferiores a las esperadas, especialmente para BPA y E, cuyas concentraciones experimentales fueron un 73% y un 74% menores, respectivamente, en comparación con el valor inicial (1 ppm). Las recuperaciones para MeP, PrP, BuP y BP se situaron entre el 83,0 y el 64,7%, mientras que BPA y E presentaron los valores más bajos, con recuperaciones del 26,8% y el 25,8%, respectivamente. Dado que en los experimentos LO el filtrado no afectó a la concentración, esta pérdida en los experimentos LOM puede atribuirse a la presencia de biomasa microalgal. Una posible explicación es que la biomasa retenida en el filtro durante el paso de la muestra haya actuado como adsorbente, provocando la retención de parte de los contaminantes en su pared celular, e impidiendo su recuperación posterior. A pesar de estas pérdidas, el filtrado previo resultó imprescindible, ya que la biomasa presente en las muestras LOM obstruía los cartuchos de SPE, imposibilitando su uso directo. Una vez estimadas las pérdidas asociadas al filtrado y, con el fin de comparar adecuadamente las condiciones abióticas con aquellas en presencia de microalgas, las concentraciones de CDEs en todos los experimentos se normalizaron, expresándose como  $C/C_0$ .

Por otro lado, también se consideró necesario evaluar si algún subproducto de degradación o metabolito liberado por la microalga podría interferir en la determinación y cuantificación de los compuestos de interés. Para ello, se prepararon seis réplicas adicionales bajo condiciones LO y LOM con *Scenedesmus* sp., dejando tres muestras durante un día y otras tres durante cuatro días. Los cromatogramas obtenidos para las muestras LO se presentan en la Figura 4 - 21. Tal como puede observarse, con el tiempo aparece progresivamente una serie de picos adicionales, correspondientes con productos de degradación de los contaminantes. No obstante, los tiempos de retención de estos subproductos no coincidieron con los de los CDEs, por lo que no se comprometió la cuantificación de los compuestos de interés.

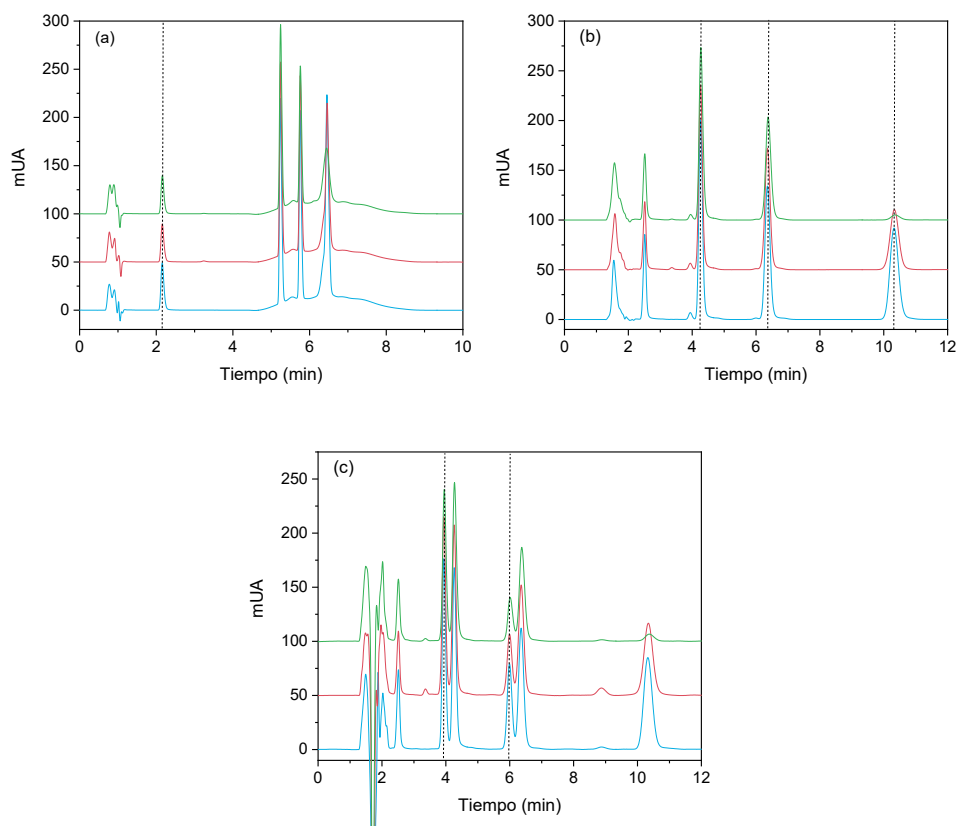


Figura 4 - 21. Cromatogramas para las pruebas LO a día 0 (azul), día 1 (rojo) y día 4 (verde) con el método 2 (en gradiente) a 254 nm (a) y con el método 1 (isocrático) a 254 nm (b) y a 210 nm (c).

Del mismo modo, en los cromatogramas correspondientes a las muestras LOM se detectaron picos adicionales correspondientes con subproductos de degradación de los contaminantes (Figura 4 - 22). Al igual que en el caso anterior, los tiempos de retención de estos compuestos no coincidieron con los de los CDEs de interés, lo que confirma que su cuantificación no se vio afectada.

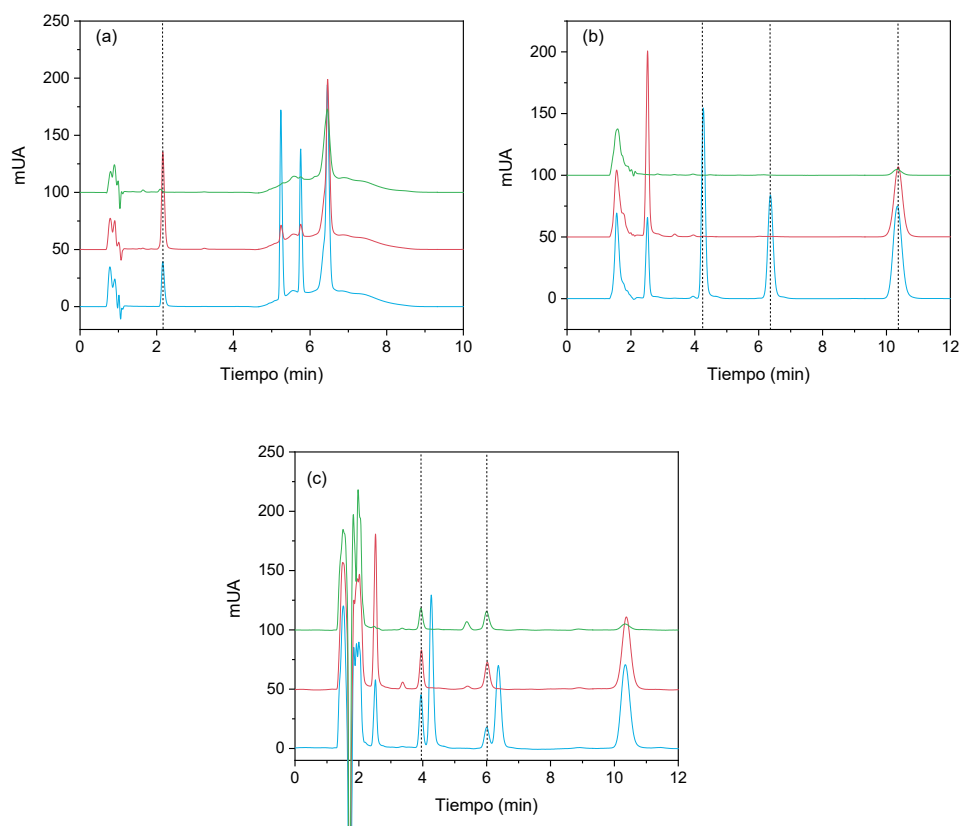


Figura 4 - 22. Cromatogramas para las pruebas LOM a día 0 (azul), día 1 (rojo) y día 4 (verde) con el método 2 (gradiente) a 254 nm (a) y con el método 1 (isocrático) a 254 nm (b) y a 210 nm (c).

Finalmente, se realizó un calibrado de la mezcla de CDEs en agua residual real (ARR) para evaluar cómo esta matriz afectaba al método de extracción en fase sólida. Para ello, se prepararon seis disoluciones de CDEs en ARR que, tras ser preconcentradas, alcanzaron concentraciones de 15, 12, 9, 6,3, 3,3 y 0,375 ppm. Cabe destacar que, al igual que anteriormente, el ARR fue filtrada a 0,45  $\mu\text{m}$  antes de llevar a cabo la extracción. Como se observa en la Figura 4 - 23, se obtuvieron valores de  $R^2$  de 0,99 en todos los casos, excepto para MeP, compuesto para el cual se logró un ajuste menor de 0,97.

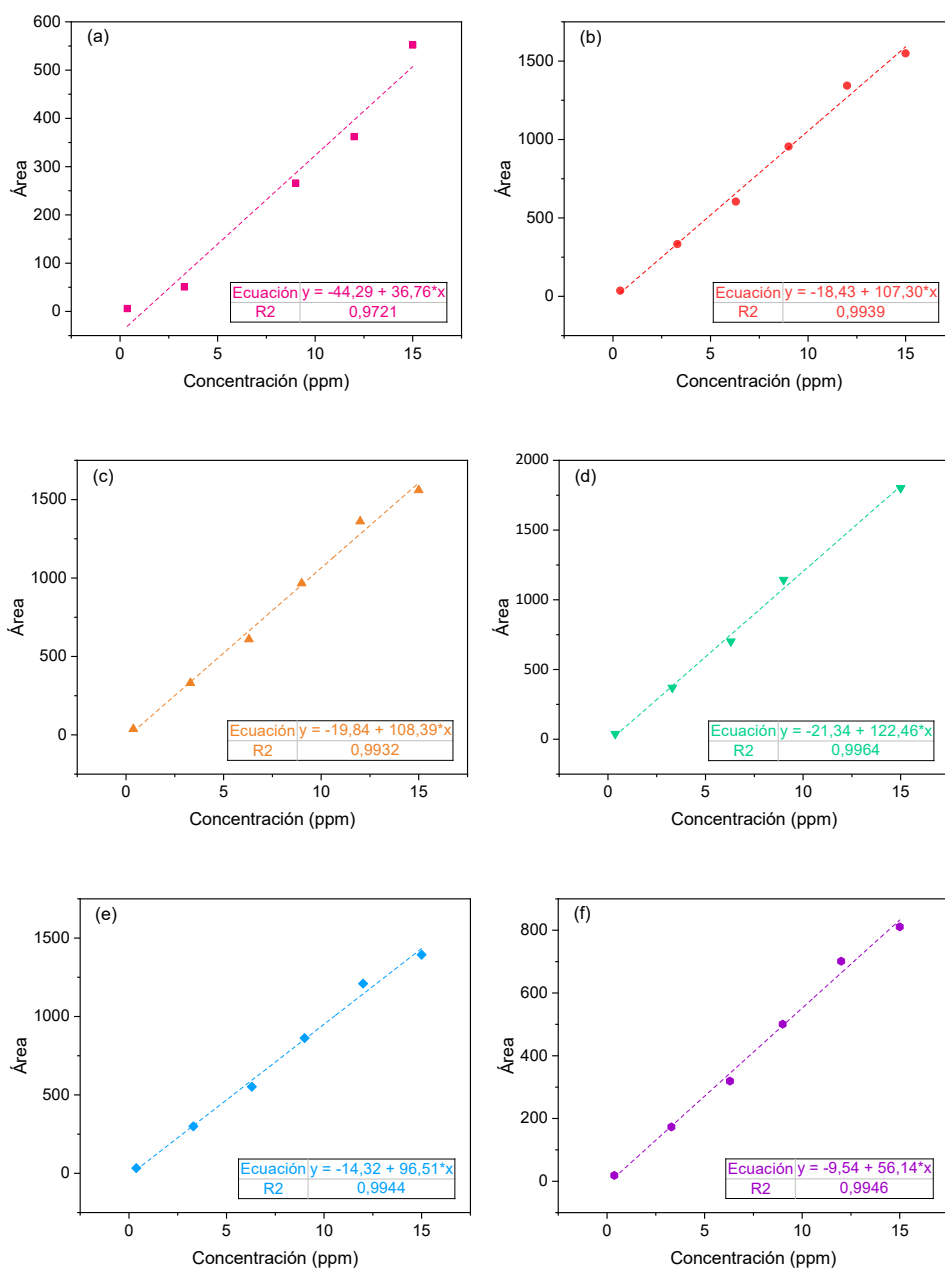


Figura 4 - 23. Calibrados preparados en ARR tras la extracción en fase sólida para (a) MeP, (b) PrP, (c) BuP, (d) BP, (e) BPA y (f) E.

Estos resultados confirman la fiabilidad del método combinado de SPE y HPLC desarrollado para el análisis de CDEs en este tipo de muestras complejas.

## 4.2. Evaluación de un sistema basado en microalgas como tratamiento biológico

Para llevar a cabo el estudio de la eliminación de CDEs, se cultivaron *Scenedesmus* sp. y *C. vulgaris* por separado en ARS, cuya preparación se detalla en la sección 3.2.3. La composición de este ARS es similar a la del agua residual tras la decantación primaria, antes de su paso por el reactor biológico, por lo que su principal fuente de nitrógeno sigue siendo el amonio, lo que influye directamente al crecimiento de las especies. Durante 7 días se monitorizó el crecimiento de la biomasa, el pH, la eliminación de nutrientes y, principalmente, la de CDEs. Asimismo, se incluyeron controles en ausencia de contaminantes.

Junto con el análisis de la degradación de los contaminantes en presencia de microalgas, se realizaron experimentos abióticos para determinar la influencia de la luz, el oxígeno y su combinación en la eliminación de los compuestos.

Finalmente, se evaluaron los mecanismos de eliminación de cada CDEs en función de la especie de microalga, considerando los procesos de bioadsorción, bioacumulación, biodegradación y degradación abiótica.

### 4.2.1. Crecimiento de las microalgas en ARS

El crecimiento de *Scenedesmus* sp y *C. vulgaris* se evaluó durante un periodo de 7 días en ARS, tanto en presencia como en ausencia de CDEs, tal y como se describe en la sección 3.3. En la Figura 4 - 24 (a) se observa como ambas especies fueron capaces de crecer en un medio rico en amonio como fuente de nitrógeno. Sin embargo, *C. vulgaris* mostró una mejor adaptación al agua residual sintética, alcanzando una concentración de biomasa de 0,55 g/L en el control y 0,67 g/L en las muestras en presencia de CDEs al cabo de 7 días. En contraste, *Scenedesmus* sp. presentó valores más bajos en ambos casos, con concentraciones de 0,34 y 0,29 g/L para el control y las muestras en presencia de CDEs, respectivamente. Las diferencias observadas en el crecimiento se deben a la preferencia de *C. vulgaris* por el amonio como fuente de nitrógeno, consumiéndolo antes que los nitratos, incluso cuando ambos están presentes en el medio [362]. Por el contrario, *Scenedesmus* sp. muestra bajas concentraciones de biomasa cuando el amonio es la fuente de nitrógeno en el medio en comparación con otras fuentes como los nitratos o la urea [363].

Al comparar el crecimiento en presencia de CDEs con sus respectivos controles, se observó que la presencia de estos contaminantes no afectó negativamente al crecimiento de las microalgas. La prueba t de Student para medias de dos muestras emparejadas reveló que la presencia de CDEs en el medio no afectó significativamente el crecimiento de las microalgas ( $p > 0,05$ ), excepto en el día 1 de ambas especies y en el día 7 para *C. vulgaris* ( $p < 0,05$ ), donde los CDEs mejoraron su

crecimiento. De acuerdo con estudios previos, la presencia de CDEs en bajas concentraciones no tiene efectos negativos sobre el crecimiento de las microalgas, pudiendo adaptarse a dichos contaminantes y, potencialmente, incluso mejorar su crecimiento. Por ejemplo, la microalga *Tetraselmis* sp. demostró una buena adaptación a la presencia en el medio de cultivo de 1 ppm de BPA, sin que su crecimiento se viera afectado en comparación a un control sin contaminantes. Resultados similares se obtuvieron en presencia de 0,5 ppm de 17  $\alpha$ -etinilestradiol o 0,1 ppm de NP [364]. Por otro lado, el crecimiento de *C. vulgaris* mejoró en presencia de concentraciones de MeP entre 1 y 5 ppm, alcanzándose aproximadamente un 64% y un 20% más de densidad en el cultivo respecto al control, respectivamente [264].

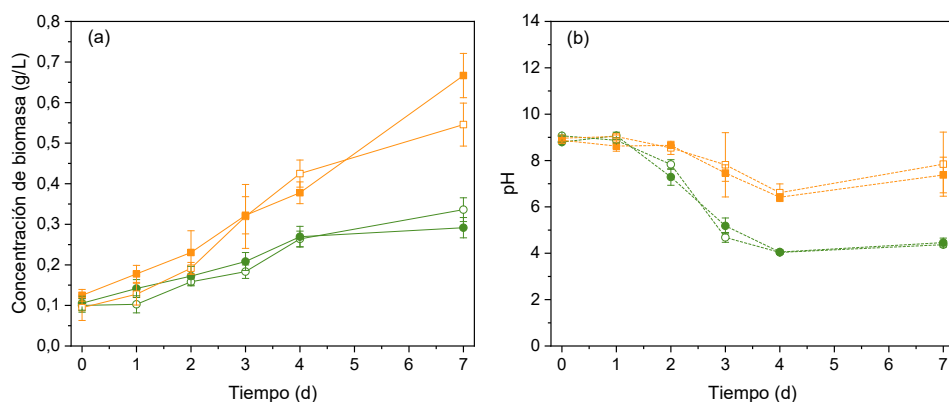


Figura 4 - 24. (a) Curvas de crecimiento durante 7 días para *Scenedesmus* sp en presencia (dopado – círculo sólido verde) y ausencia (control – círculo abierto verde) de CDEs y para *C. vulgaris* en presencia (dopado – cuadrado sólido naranja) y ausencia (control – cuadrado abierto naranja) de CDEs. (b) Curvas de pH durante 7 días para el control (círculo abierto línea discontinua verde) y la muestra dopada (círculo sólido línea discontinua verde) de *Scenedesmus* sp. y para el control (cuadrado abierto línea discontinua naranja) y la muestra dopada (cuadrado sólido línea discontinua naranja) de *C. vulgaris*. Las barras de error representan la  $\pm$  desviación estándar de la media ( $n=3$ ).

Al igual que con el crecimiento, no se encontraron diferencias significativas ( $p>0,05$ ) en la evolución del pH entre los controles y las muestras en presencia de CDEs de ambas especies. La Figura 4 - 24 (b) muestra un descenso continuo del pH para *Scenedesmus* sp., desde un valor inicial de 9 hasta aproximadamente 4 en un periodo de 7 días, debido a la liberación de protones  $H^+$  durante el consumo de amonio [365], por debajo del rango óptimo de esta especie (6,5 – 8,5) [366]. En la Figura 4 - 24 (b) se observó como el día 3 el pH se encontraba por debajo de 6,5, lo que coincidió con un descenso en el crecimiento (Figura 4 - 24 (a)). La relación entre la reducción del pH y la inhibición del crecimiento de *Scenedesmus* sp. ha sido documentada previamente en literatura. Un pH ácido actúa como inhibidor enzimático de la fotosíntesis, afectando a las reacciones del fotosistema II (PSII), el cual es responsable de la oxidación del agua en presencia de luz, generando moléculas de oxígeno, protones y electrones [367]. Como consecuencia del

desajuste en las reacciones del PSII en condiciones de pH bajo, se produce una disminución en la densidad algal [368].

En la Figura 4 - 25 se presenta la productividad diaria de la biomasa que se obtuvo para ambas especies. Como se observa en la Figura 4 - 25 (a), durante el primer día de cultivo de *Scenedesmus* sp. la producción de biomasa fue mínima, alcanzándose aproximadamente  $5,0\text{E-}04$  g/L·h para el control y  $1,0\text{E-}03$  g/L·h para las muestras dopadas, sin variación de pH. Entre los días 1 y 4 la producción de biomasa aumentó, alcanzando un máximo de  $3,4\text{E-}03$  g/L·h para el control y  $3,1\text{E-}03$  g/L·h para las muestras dopadas entre los días 3 y 4, mientras el pH descendía hasta 4 (Figura 4 - 24 (b)). De los días 5 al 7 la producción de biomasa disminuyó nuevamente, registrándose  $1,0\text{E-}03$  g/L·h para el control y  $4,0\text{E-}04$  g/L·h para las muestras dopadas, con el pH manteniéndose constante en 4 (Figura 4 - 24(b)).

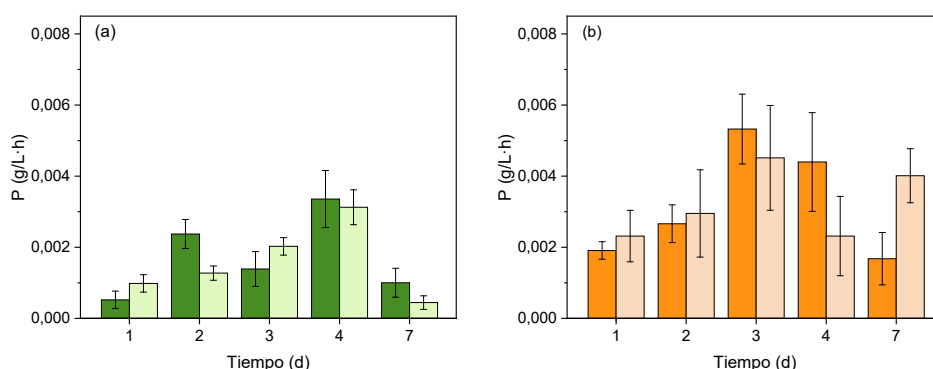


Figura 4 - 25. Producción de biomasa obtenida para (a) *Scenedesmus* sp. control (verde oscuro) y muestras dopadas (verde claro) y (b) *Chlorella vulgaris* control (naranja oscuro) y muestras dopadas (naranja claro) en 7 días. Las barras de error representan la  $\pm$  desviación estándar de la media ( $n=3$ ).

En el caso de *C. vulgaris*, la Figura 4 - 24 (b) muestra que el pH se mantuvo dentro del rango óptimo (6,0-9,0) para esta especie durante los 7 días [369]. Además, la Figura 4 - 25 (b) indica, en general, una mayor producción de biomasa en comparación con *Scenedesmus* sp. tanto para el control como para las muestras dopadas, lo que se traduce en una mayor densidad algal (Figura 4 - 24 (a)) y una mayor actividad fotosintética. Un estudio previo de García et al. (2006) sugirió que una alta actividad fotosintética de las algas provoca un aumento del pH, previniendo así la acidificación del medio [370]. Este fenómeno podría estar ocurriendo en *C. vulgaris*, explicando los elevados índices de crecimiento observados en esta especie.

Finalmente, la biomasa recogida transcurridos los 7 días de los experimentos LOM fue caracterizada, obteniéndose los resultados que se muestran en la Tabla 4 - 16, donde se recoge el contenido en carbohidratos, lípidos, proteínas y cenizas en peso seco para cada especie en ausencia y presencia de CDEs.

Para *Scenedesmus* sp., los resultados de la prueba t entre las muestras en ausencia y en presencia de CDEs indicaron que, salvo para el contenido en carbohidratos, no se encontraron diferencias significativas ( $p>0,05$ ). Esto sugiere que la presencia de contaminantes tampoco afectó, en general, a la composición de esta especie. Por otro lado, se obtuvo un contenido de lípidos que coincide con lo reportado por Garcia-Moscoso et al. (2013), situándose entre el 12 y el 14% [371], y un contenido en carbohidratos típico que varía entre el 10 y el 52% [372]. Como puede observarse, las proteínas son mayoritarias en esta especie, con contenidos similares a los previamente reportados en la literatura para *Scenedesmus obliquus* entre el 60 y el 70%, y para *Scenedesmus acutus* entre el 50 y el 60% [373].

En el caso de *C. vulgaris* no se observan diferencias significativas ( $p>0,05$ ) en el contenido de carbohidratos, proteínas y cenizas al aplicar una prueba t entre los datos en presencia y en ausencia de CDEs, sin embargo, los lípidos sí que sufrieron un aumento significativo entre el control y las muestras dopadas. Esto sugiere que la presencia de contaminantes afectó ligeramente a la composición de esta especie. En cuanto a los valores obtenidos, la cantidad de proteínas fue ligeramente superior a lo reportado en bibliografía [374], que oscila entre el 43 y el 61%. Por otro lado, los lípidos y carbohidratos se encontraron dentro del rango habitual para esta especie, entre el 5 y el 40% para los lípidos y el 12 y el 55% para los carbohidratos [375].

Tabla 4 - 16. Contenido en carbohidratos, lípidos, proteínas y cenizas para *Scenedesmus* sp. y *C. vulgaris* en ausencia y presencia de CDEs. Los errores representan la  $\pm$  desviación estándar de la media ( $n=3$ ).

|                              | <i>Scenedesmus</i> sp |                  | <i>C. vulgaris</i> |                  |
|------------------------------|-----------------------|------------------|--------------------|------------------|
|                              | Control               | Dopada           | Control            | Dopada           |
| <b>Carbohidratos (% p/p)</b> | 18,7 $\pm$ 0,66       | 22,03 $\pm$ 0,53 | 21,40 $\pm$ 1,12   | 21,91 $\pm$ 0,65 |
| <b>Lípidos (% p/p)</b>       | 12,9 $\pm$ 0,50       | 13,31 $\pm$ 0,61 | 5,02 $\pm$ 0,28    | 10,51 $\pm$ 0,33 |
| <b>Proteínas (% p/p)</b>     | 60,4 $\pm$ 0,25       | 60,70 $\pm$ 0,40 | 68,62 $\pm$ 3,00   | 63,13 $\pm$ 0,76 |
| <b>Cenizas (% p/p)</b>       | 4,6 $\pm$ 0,56        | 4,80 $\pm$ 0,07  | 4,84 $\pm$ 0,03    | 4,45 $\pm$ 0,52  |

La composición elemental de cada una de las biomásas se presenta en la Tabla 4 - 17, siendo los valores obtenidos en ambos casos similares a los reportados previamente en bibliografía [376–378]. Al comparar las muestras control con las dopadas mediante una prueba t, no se encontraron diferencias significativas en las composiciones elementales de *Scenedesmus* sp. ( $p>0,05$ ). Sin embargo, *C. vulgaris* mostró diferencias significativas en los contenidos de N, C, H y S ( $p<0,05$ ), indicando ligeras diferencias en los contenidos de los elementos analizados.

Tabla 4 - 17. Composición elemental para *Scenedesmus sp.* y *C. vulgaris* en ausencia y presencia de CDEs. Los errores representan la  $\pm$  desviación estándar de la media (n=3).

|           | <b>Scenedesmus sp</b> |                  | <b>C. vulgaris</b> |                  |
|-----------|-----------------------|------------------|--------------------|------------------|
|           | Control               | Dopada           | Control            | Dopada           |
| <b>%N</b> | 7,46 $\pm$ 0,04       | 7,27 $\pm$ 0,22  | 6,94 $\pm$ 0,02    | 6,28 $\pm$ 0,04  |
| <b>%C</b> | 48,71 $\pm$ 0,28      | 49,33 $\pm$ 1,21 | 49,59 $\pm$ 0,33   | 51,10 $\pm$ 0,48 |
| <b>%H</b> | 6,99 $\pm$ 0,03       | 7,09 $\pm$ 0,13  | 7,07 $\pm$ 0,05    | 7,49 $\pm$ 0,11  |
| <b>%S</b> | 0,25 $\pm$ 0,02       | 0,23 $\pm$ 0,02  | 0,27 $\pm$ 0,02    | 0,11 $\pm$ 0,03  |
| <b>%O</b> | 31,29 $\pm$ 0,32      | 31,21 $\pm$ 0,40 | 30,59 $\pm$ 0,49   | 29,48 $\pm$ 0,35 |

Además, se midió el potencial Zeta de la superficie de la biomasa cosechada, cuyos resultados se presentan en la Tabla 4 - 18. Este parámetro se define como la diferencia de potencial eléctrico entre la superficie de una partícula y un punto del líquido circundante alejado de la interfase, y constituye un indicador clave de las propiedades fisicoquímicas de la pared celular de las microalgas [379,380]. Por lo tanto, se utilizó para evaluar si la exposición a los CDEs provocaba modificaciones en dichas propiedades.

Tabla 4 - 18. Potencial Zeta para *Scenedesmus sp.* y *C. vulgaris* en ausencia y presencia de CDEs. Los errores representan la  $\pm$  desviación estándar de la media (n=3).

| <b>Especie</b>                 | <b>Potencial Zeta (mV)</b> |
|--------------------------------|----------------------------|
| <i>Scenedesmus sp.</i> control | -28,6 $\pm$ 0,6            |
| <i>Scenedesmus sp.</i> dopada  | -24,8 $\pm$ 3,5            |
| <i>C. vulgaris</i> control     | -28,9 $\pm$ 3,0            |
| <i>C. vulgaris</i> dopada      | -32,2 $\pm$ 0,2            |

En general, las microalgas presentan una superficie con carga negativa, como se puede observar en la Tabla 4 - 18, atribuida a la presencia de grupos funcionales como carboxilos o hidroxilos, que se acumulan en su superficie [380]. Al comparar el potencial Zeta de las muestras en presencia y ausencia de CDEs no se encontraron diferencias significativas ( $p>0,05$ ), ni en *Scenedesmus sp.* ni en *C. vulgaris*. Estos resultados sugieren que la exposición a 1 ppm de la mezcla CDEs no alteró significativamente las propiedades fisicoquímicas de la pared celular durante el cultivo algal.

## 4.2.2. Eliminación de nutrientes y CDEs

### 4.2.2.1. Eliminación de nutrientes

La Figura 4 - 26 presenta los resultados de eliminación de amonio y fosfatos por *Scenedesmus sp.* (a) y *C. vulgaris* (b), en presencia y ausencia de CDEs, para los experimentos LOM llevados a cabo. La Figura 4 - 26 (a) muestra una eliminación completa de fosfatos al cabo de 4 días para *Scenedesmus sp.*, independientemente de la presencia de CDEs. Sin embargo, en presencia de CDEs esta eliminación completa se logró en solo 4 días, frente a los 7 días necesarios para el control

(ausencia de CDEs). En cuanto al amonio, se observó una eliminación del 48% en el control y del 32% en 7 días para las muestras que incluían CDEs. Estas bajas eficiencias de eliminación de amonio se relacionan con la baja densidad algal observada en esta especie, como se mostró en la Figura 4 - 24 (a). Estudios previos han reportado porcentajes de eliminación de amonio similares con *Scenedesmus* sp., con una reducción del 31,1% del NT tras 13 días de cultivo. Sin embargo, estos porcentajes aumentaron significativamente, alcanzando el 90,4% y el 87,8%, cuando la fuente de nitrógeno era nitrato o urea, respectivamente [363]. Como se puede observar, la presencia de CDEs no afectó al consumo de nutrientes en los primeros 3 días ( $p>0,05$ ), pero aceleró significativamente el consumo de fosfatos del cuarto día en adelante con respecto al control. Estudios previos sugieren que el consumo total de fosfatos restringe el consumo de amonio, lo que coincide con lo mostrado en la Figura 4 - 26 (a), donde se observa que en el control se eliminó significativamente más amonio en comparación con las muestras dopadas al final del experimento ( $p<0,05$ ). En este sentido, se ha reportado en bibliografía que *Scenedesmus* sp. LX1 eliminó completamente el PT del medio independientemente de la relación N/P, pero la cantidad de NT eliminada sí dependió considerablemente de dicha relación [381]. Asimismo, Wu et al. (2012) observaron una tendencia similar al cultivar *Scenedesmus* sp. en condiciones de déficit de fósforo, logrando una eliminación completa del mismo en 11 días, mientras que la eliminación de nitrógeno se mantuvo despreciable a partir de ese momento [382].

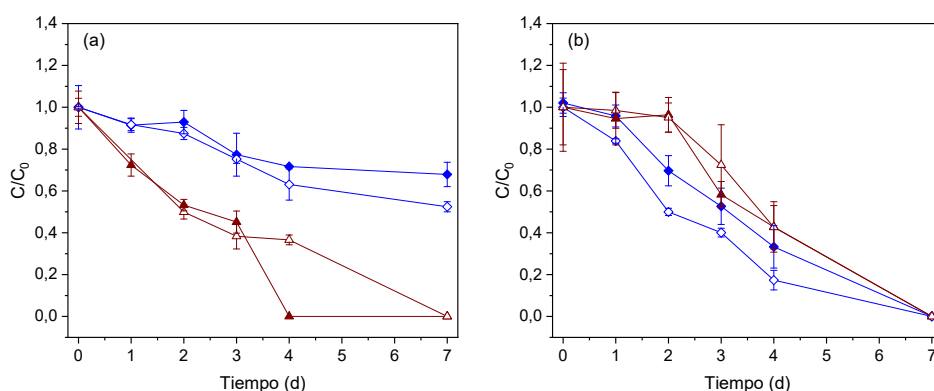


Figura 4 - 26. Eliminación de fosfatos (control – triángulo marrón abierto y muestras dopadas – triángulo marrón cerrado) y amonio (control – rombo azul abierto y muestras dopadas – rombo azul cerrado) por *Scenedesmus* sp. (a) y *C. vulgaris* (b). Las barras de error representan la  $\pm$  desviación estándar de la media ( $n=3$ ).

En la Figura 4 - 26 (b) se puede observar una completa eliminación de fosfatos y amonio en 7 días por *C. vulgaris*, tanto en presencia como en ausencia de CDEs. En cuanto a los fosfatos, la presencia de CDEs no afectó al consumo de este nutriente. Estos resultados de eliminación completa de nutrientes concuerdan con los reportados en la literatura. Así, Kim et al. (2013) encontraron que *C. sorokiniana*

eliminó el 100% de amonio y fósforo en 7 días cuando la concentración inicial de nitrógeno se encontraba entre 20 y 40 mg N/L [383]. Además, *C. vulgaris* cultivada en diferentes efluentes de digestión anaerobia mostró prácticamente una eliminación total de amonio y fosfatos en 10 días, cuando la concentración inicial de amonio fue de 40 mg N/L [384].

Finalmente, en la Figura 4 - 27 se presentan los valores de eliminación de DQO obtenidos con *Scenedesmus* sp. y *C. vulgaris*. En la Figura 4 - 27 (a) se observó una eliminación completa de la DQO con *Scenedesmus* sp. en presencia de CDEs tras 7 días de cultivo, mientras que en ausencia de contaminantes la eliminación se redujo a un 60%. De manera similar, en la Figura 4 - 27 (b), *C. vulgaris* mostró una tendencia comparable en el consumo de DQO, alcanzando también una eliminación del 100% en las muestras dopadas y un 74% en el control, en un periodo de 7 días.

Estos resultados están en línea con datos reportados en la literatura, donde ya se han documentado altos porcentajes de eliminación de DQO empleando microalgas. Por ejemplo, Silambarasan et al. (2023) reportaron eliminaciones de DQO entre el 74,3% y el 91,4% empleando *Scenedesmus* sp. cultivada en agua residual diluida en distintos porcentajes durante 14 días [385]. Asimismo, Pham et al. (2020) registraron porcentajes de eliminación entre el 73,5% y el 92,6% de DQO con concentraciones iniciales de *Scenedesmus* sp. entre 10 mg/L y 60 mg/L en 10 días [386]. Por su parte, Wang et al. (2015) obtuvieron eliminaciones de DQO del 70,2%, 70,0% y 60,5% utilizando *C. vulgaris* cultivada en purines diluidos 20, 10 y 5 veces, respectivamente, tras 11 días de tratamiento [387].

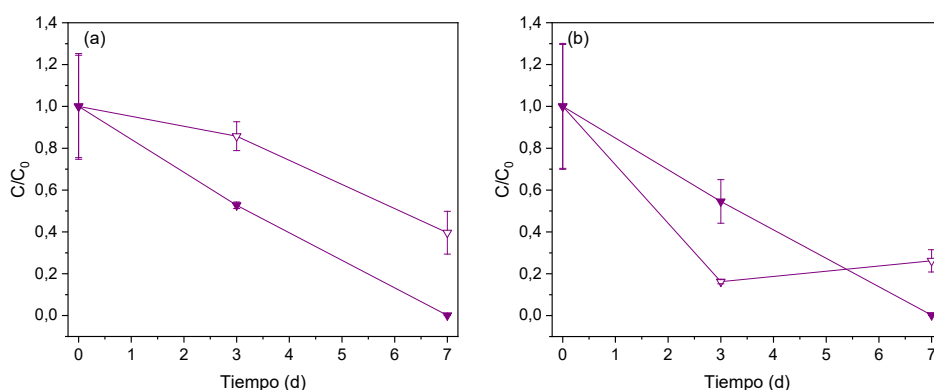


Figura 4 - 27. Eliminación de DQO (control – triángulo invertido morado abierto y muestras dopadas – triángulo invertido morado cerrado) por *Scenedesmus* sp. (a) y *C. vulgaris* (b). Las barras de error representan la  $\pm$  desviación estándar de la media ( $n=3$ ).

Una vez determinado el consumo de nutrientes, y teniendo en cuenta las curvas de crecimiento de la biomasa algal se ajustó el crecimiento de *Scenedesmus* sp. y *C. vulgaris* a un modelo cinético de Monod. Los datos experimentales se ajustaron a las ecuaciones ( 10 ) y ( 11 ) linealizadas, empleando como sustrato la concentración de

amonio en la primera. A partir de la pendiente de las rectas obtenidas se calcularon la tasa de crecimiento máximo ( $\mu_{\max}$ ) y la constante de saturación ( $K_s$ ). Los valores obtenidos para ambos parámetros se recogen en la Tabla 4 - 19.

Como puede observarse en la Tabla 4 - 19, con *Scenedesmus* sp. se obtuvo un valor de  $\mu_{\max}$  idéntico tanto en ausencia como en presencia de CDEs (0,19 d<sup>-1</sup>). Tal como se había comentado previamente, no se observaron diferencias en el crecimiento entre el control y las muestras dopadas para esta especie, por lo que resulta coherente que este parámetro no se haya visto afectado por la presencia de contaminantes en el medio. El valor de  $\mu_{\max}$  obtenido coincide con rangos reportados en bibliografía para *Scenedesmus* sp., que varían entre 0,14 y 0,62 d<sup>-1</sup> según la concentración de nutrientes o la intensidad de la luz [388]. En cuanto a la  $K_s$  se alcanzaron valores elevados para *Scenedesmus* sp., junto con un pobre ajuste de los datos al modelo, reflejado en los bajos coeficientes de regresión, de 0,576 para el control y 0,525 para las muestras dopadas. Estos resultados refuerzan la hipótesis de una baja afinidad de esta especie por el amonio como fuente de nitrógeno. Sin embargo, estudios previos han reportado valores de  $K_s$  entre 7,8 y 13,3 mg/L al emplear nitratos como fuente de nitrógeno con esta misma especie [381,388].

Tabla 4 - 19. Parámetros cinéticos de Monod para *Scenedesmus* sp. y *C. vulgaris* en ausencia y presencia de CDEs.

| Especie                        | $\mu_{\max}$ (d <sup>-1</sup> ) (R <sup>2</sup> ) | $K_s$ (mg/L) (R <sup>2</sup> ) |
|--------------------------------|---------------------------------------------------|--------------------------------|
| <i>Scenedesmus</i> sp. control | 0,19 (0,969)                                      | 70,68 (0,576)                  |
| <i>Scenedesmus</i> sp. dopada  | 0,19 (0,935)                                      | 312,26 (0,525)                 |
| <i>C. vulgaris</i> control     | 0,30 (0,956)                                      | 7,14 (0,987)                   |
| <i>C. vulgaris</i> dopada      | 0,32 (0,961)                                      | 3,02 (0,842)                   |

Por otro lado, los valores de  $\mu_{\max}$  obtenidos con *C. vulgaris*, tanto en ausencia como en presencia de CDEs, fueron más elevados que los registrados con *Scenedesmus* sp.. Esto concuerda con lo comentado anteriormente, ya que *C. vulgaris* muestra una mayor afinidad por el amonio como fuente de nitrógeno. Al comparar el control con las muestras dopadas de *C. vulgaris* se observa que la presencia de CDEs en el medio de cultivo produjo un ligero aumento de  $\mu_{\max}$ , lo que es compatible con los resultados de crecimiento observados, donde la biomasa producida fue superior en los últimos días del cultivo con contaminantes respecto al control. Respecto a los valores de  $K_s$ , estos fueron notablemente más bajos en *C. vulgaris* que en *Scenedesmus* sp., lo que refuerza su mayor capacidad de asimilación de amonio. Además, en presencia de CDEs, *C. vulgaris* mostró una  $K_s$  aún menor (3,02 mg/L frente a 7,14 mg/L en el control), lo que sugiere que los contaminantes no afectaron negativamente a la afinidad por el sustrato. Estos resultados se encuentran en consonancia con estudios previos, aunque su comparación es complicada ya que estos parámetros cinéticos dependen en gran medida de las condiciones de cultivo.

Así, Kim et al. (2013) reportaron un valor de  $\mu_{\max}$  de aproximadamente  $0,3 \text{ d}^{-1}$  y de  $K_s$  de  $2,1 \text{ mg/L}$  para *C. vulgaris* [389].

#### 4.2.2.2. Eliminación de CDEs

En este apartado se evaluó la influencia de la luz, el oxígeno y la presencia de microalga en la degradación de cada uno de los CDEs. Para ello se analizaron los resultados obtenidos en los experimentos realizados con aireación, pero en ausencia de luz y microalga (experimentos O), con presencia de luz y sin aireación ni microalga (experimentos L), con luz y aireación combinadas, pero sin microalga (experimentos LO) y finalmente, los experimentos que incluyeron microalga, luz y aireación (experimentos LOM).

Como se observa en la Figura 4 - 28 (a), (b) y (c), los parabenos no presentan una degradación abiótica representativa (experimentos O y LO). La mayor degradación abiótica entre los parabenos se observó en el BuP (Figura 4 - 28 (c)), con un 39% para la oxidación (experimento O) y un 21% para la fotooxidación (experimento LO). Sin embargo, la presencia de microalgas mejoró la eliminación para todos estos compuestos, resultando en una eliminación completa en 7 días con ambas especies de microalgas. Al comparar la degradación obtenida con *Scenedesmus* sp. y *C. vulgaris*, se observó que para el PrP y el BuP no existen diferencias significativas entre las especies, alcanzándose en ambos casos una eliminación completa en aproximadamente 2 días. Sin embargo, *C. vulgaris* logró un 100% de eliminación de MeP en solo 6 horas, mientras que *Scenedesmus* sp. necesitó 48 horas para alcanzar su eliminación total. Estos resultados coinciden con los observados por otros autores, ya que, como se ha reportado previamente, el uso de *C. vulgaris* resulta en elevadas eficiencias de eliminación de MeP, alcanzando un 100% de degradación en 2 días para una concentración de 1 ppm de MeP [264]. Además, tal y como aparece en bibliografía, se ha obtenido una eliminación completa de  $47,4 \text{ ng/L}$  de MeP y  $3,8 \text{ ng/L}$  de PrP en 7 días utilizando *C. reinhardtii*, *S. obliquus*, *C. pyrenoidosa* y *C. vulgaris* por separado [390].

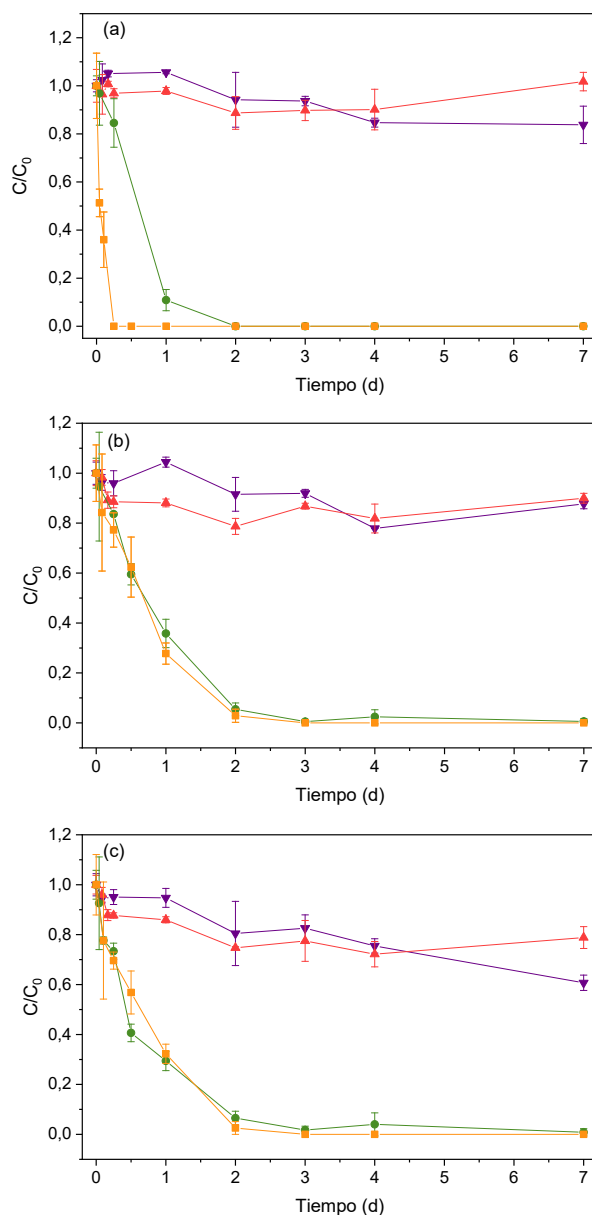


Figura 4 - 28. Eliminación de MeP (a), PrP (b) y BuP (c): experimentos O (triángulo invertido morado), experimentos LO (triángulo rojo) y experimentos LOM con *Scenedesmus* sp. (círculo verde) y con *C. vulgaris* (cuadrado naranja). Los experimentos se llevaron a cabo durante 7 días. Las barras de error representan la  $\pm$  desviación estándar de la media (n=3).

En cuanto a la eliminación de BP, se observaron elevadas eficiencias de eliminación independientemente de las condiciones en las que se realizó el experimento, como se muestra en la Figura 4 - 29. Las eficiencias de degradación de BP para los experimentos LOM fueron del 86% para *Scenedesmus* sp. y del 62% para *C. vulgaris*, valores inferiores a los obtenidos en los experimentos O y LO, que fueron del 91% y 95%, respectivamente. Esto sugiere que, para este compuesto, la presencia

de microalgas no mejora su eliminación, siendo probablemente la degradación de tipo abiótica su principal vía de eliminación.

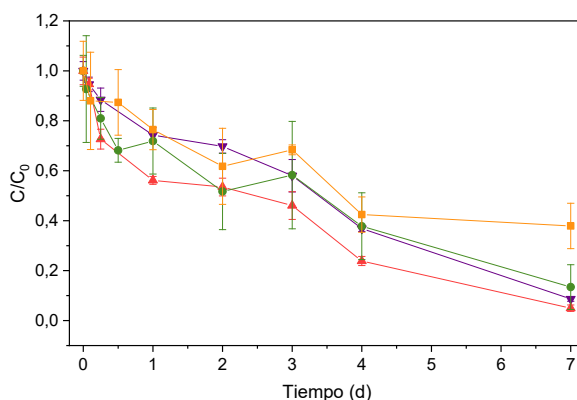


Figura 4 - 29. Eliminación de BP: experimentos O (triángulo invertido morado), experimentos LO (triángulo rojo) y experimentos LOM con *Scenedesmus* sp. (círculo verde) y con *C. vulgaris* (cuadrado naranja). Los experimentos se llevaron a cabo durante 7 días. Las barras de error representan la  $\pm$  desviación estándar de la media ( $n=3$ ).

Los resultados de la prueba t de Student para muestras emparejadas de los experimentos O y LO para BP mostraron que, excepto a las 24 horas, no hubo diferencias significativas ( $p>0,05$ ) entre las tasas de eliminación de ambos experimentos. Esto sugiere que la luz no es un parámetro que influya en la degradación de este compuesto, lo cual también se observa en la Figura 4 - 30, que presenta los resultados de eliminación para todos los CDEs analizados en los experimentos L (solo con luz), en los que se alcanzó una degradación de BP del 20% tras 7 días.

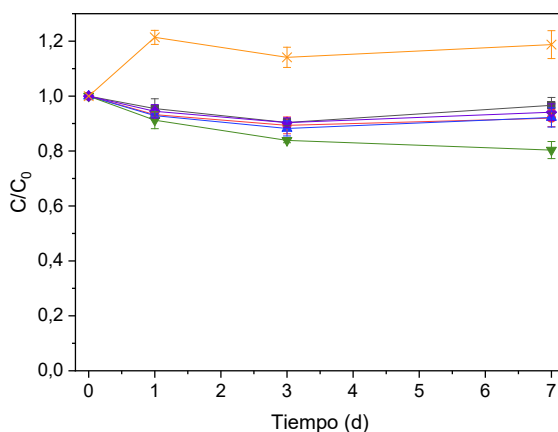


Figura 4 - 30. Degradación de CDEs para los experimentos L de: MeP (cuadrado negro), PrP (círculo rojo), BuP (triángulo azul), BP (triángulo invertido verde), BPA (rombo morado) y E (cruz naranja). Las barras de error representan la  $\pm$  desviación estándar de la media ( $n=3$ ).

A la vista de estos resultados, la degradación abiótica de BP se podría atribuir a la oxidación debido a la presencia de oxígeno en el medio. Estudios previos han propuesto que las especies reactivas de oxígeno (ROS) involucradas en la fototransformación de BP-3 son los radicales hidroxilo ( $\text{OH}\cdot$ ) y los radicales superóxido ( $\cdot\text{O}_2$ ) [391]. Además, Chen et al. (2015) sugirieron que la BP puede degradarse de forma natural cuando está presente en las aguas a bajas concentraciones, posiblemente debido a la presencia de iones como  $\text{Cl}^-$ ,  $\text{Fe}^{3+}$  o  $\text{NO}_3^-$  [392].

La Figura 4 - 31 muestra la degradación del BPA para los diferentes experimentos analizados. Este contaminante se eliminó de forma abiótica en aproximadamente un 20% (experimentos O y LO) en 7 días, porcentaje que coincide con lo recogido previamente en bibliografía [393]. Además, la fotodegradación (experimentos L) fue despreciable, como puede observarse en la Figura 4 - 30. Por el contrario, la presencia *Scenedesmus* sp. y *C. vulgaris* (experimentos LOM) mejoró la eliminación de BPA hasta un 82% y un 90%, respectivamente. Aunque ambas especies lograron degradaciones similares a los 7 días, *Scenedesmus* sp. llevó a cabo una eliminación más gradual, degradando casi todo durante los primeros 2 días, mientras que *C. vulgaris* eliminó este compuesto mayoritariamente durante los últimos 3 días. Estos resultados de eliminación coinciden con los obtenidos previamente en otros trabajos. Así, se han reportado tasas de eliminación del 96% de BPA en 90 horas con un consorcio de microalgas de la clase Chlorophyceae y cianobacterias, empleando una concentración inicial de 10 ppb [394]. Además, Li et al. (2009) obtuvieron una degradación de BPA cercana al 92% en 13 días utilizando *Stephanodiscus hantzschii* en un medio con 1 ppm de este contaminante [395].

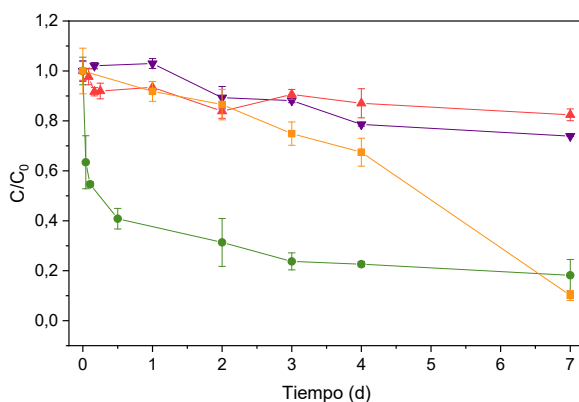


Figura 4 - 31. Eliminación de BPA: experimentos O (triángulo invertido morado), experimentos LO (triángulo rojo) y experimentos LOM con *Scenedesmus* sp. (círculo verde) y con *C. vulgaris* (cuadrado naranja). Los experimentos se llevaron a cabo durante 7 días. Las barras de error representan la  $\pm$  desviación estándar de la media ( $n=3$ ).

Al analizar la eliminación de E (Figura 4 - 32), se observó que durante los primeros 3 días la degradación abiótica (experimentos O y LO) fue prácticamente despreciable (alrededor del 20%), alcanzándose valores similares a los obtenidos para el BPA en ese periodo (Figura 4 - 31). Sin embargo, esta degradación abiótica fue más significativa entre los días 4 y 7, alcanzando eliminaciones finales del 63% para la oxidación (experimentos O) y del 40% para la fotooxidación (experimentos LO). Además, como se muestra en la Figura 4 - 30, la luz tampoco fue un factor determinante en la eliminación de la E.

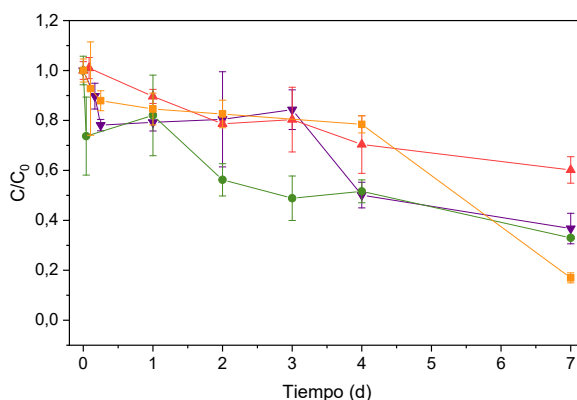


Figura 4 - 32. Eliminación de E: experimentos O (triángulo invertido morado), experimentos LO (triángulo rojo) y experimentos LOM con *Scenedesmus* sp. (círculo verde) y con *C. vulgaris* (cuadrado naranja). Los experimentos se llevaron a cabo durante 7 días. Las barras de error representan la  $\pm$  desviación estándar de la media ( $n=3$ ).

Dado que la degradación abiótica fue una de las principales vías de degradación para BP y E, se estudió el posible efecto sinérgico entre ambos contaminantes. La Figura 4 - 33 (a) muestra los resultados de eliminación de BP en el experimento LO sin la presencia de E en el medio, mientras que la Figura 4 - 33 (b) presenta la degradación de E en las mismas condiciones experimentales, pero en ausencia de BP. Como se puede observar, la BP se degradó abióticamente independientemente de la presencia de E en el medio (Figura 4 - 33 (a)), mostrando una tendencia de degradación similar e incluso alcanzando una mayor degradación a día 7 cuando E estaba presente (95% comparado con 62%). Por el contrario, E no se degradó abióticamente bajo las condiciones LO en ausencia de BP (Figura 4 - 33 (b)). Estos resultados sugieren una sinergia positiva en la degradación de ambos compuestos cuando están presentes simultáneamente en el medio.

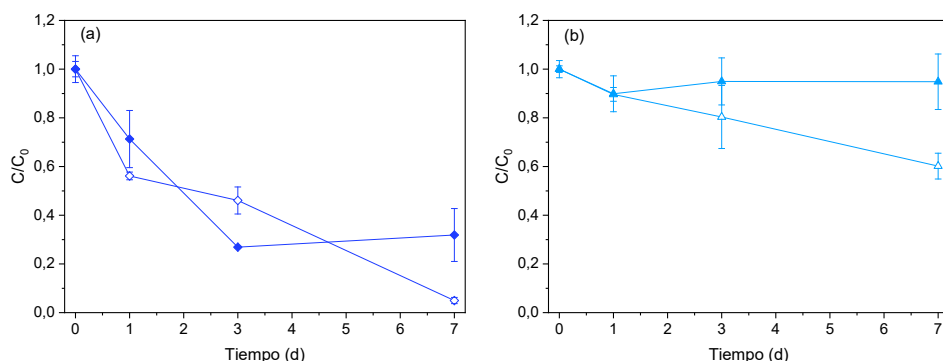


Figura 4 - 33. Eliminación de (a) BP en presencia (rombo azul abierto) y ausencia de E (rombo azul cerrado) y de (b) E en presencia (triángulo abierto azul) y ausencia de BP (triángulo cerrado azul). Las barras de error representan la  $\pm$  desviación estándar de la media ( $n=3$ ).

Además, se evaluó también la posibilidad de que alguno de los iones presentes en la matriz ARS estuviese contribuyendo a la degradación abiótica de los dos compuestos que mostraron este tipo de eliminación, BP y E. Para ello, se repitieron los experimentos O y LO utilizando tanto ARS como agua milliQ como medio. Los valores de concentraciones normalizadas tras 24 horas de experimento se muestran en la Figura 4 - 34. Al comparar los resultados mediante una prueba t de Student, no se encontraron diferencias significativas ( $p>0,05$ ) en las concentraciones de BP y E entre los ensayos realizados en ARS y en agua milliQ, observándose valores similares en ambos casos. Estos resultados indican que los iones presentes en la matriz ARS no favorecen la degradación abiótica de estos compuestos, por lo que la eliminación observada no puede atribuirse a la composición iónica del medio.

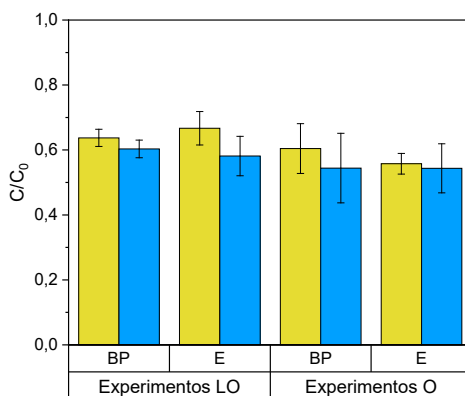


Figura 4 - 34. Comparativa de la eliminación de BP y E en ARS (verde) y en agua milliQ (azul) en 24 h para los experimentos O y LO. Las barras de error representan la  $\pm$  desviación estándar de la media ( $n=3$ ).

En cuanto a la presencia de microalgas en la eliminación de E, *C. vulgaris* mostró una drástica eliminación de este contaminante entre los días 4 y 7, alcanzando una

eliminación final del 83% en 7 días, como se puede observar en la Figura 4 - 32. Por el contrario, la eliminación proporcionada por *Scenedesmus* sp. fue más gradual, alcanzando un 70% en 7 días. Sin embargo, esta especie no mejoró la degradación de E en comparación con los experimentos O, aunque fue mayor que en los experimentos LO. Para tratar de explicar las diferencias encontradas en la degradación de E mediante las microalgas estudiadas, hay que tener en cuenta que, durante su crecimiento, las microalgas pueden producir materia orgánica extracelular algal (AEOM), compuesta principalmente por biopolímeros como polisacáridos y sustancias proteicas. Esta AEOM puede promover la producción fotoquímica de radicales de vida corta, incluyendo materia orgánica disuelta en estado triplete excitado ( $^3\text{DOM}^*$ ), oxígeno singlete ( $^1\text{O}_2$ ) y  $\text{OH}^\cdot$ , los cuales pueden contribuir a los procesos de degradación de contaminantes [396]. Estudios previos sugieren que *C. vulgaris* produce más AEOM que *Scenedesmus quadricauda*, lo que potencialmente conduce a una degradación fotocatalítica más eficiente de los estrógenos [397]. Además, la elevada eliminación de E alcanzada con *C. vulgaris* entre los días 4 y 7 (Figura 4 - 32) coincide con la mayor producción de biomasa durante la fase exponencial para esta especie (Figura 4 - 25 (b)), un periodo caracterizado por una alta actividad metabólica que favorecería una mayor liberación de AEOM [396]. Estas diferencias en la liberación de AEOM pueden explicar la variación en la eliminación final de E por parte de *C. vulgaris* y *Scenedesmus* sp., y podría estar relacionada con la tendencia similar observada en la degradación de BPA por *C. vulgaris* (Figura 4 - 31).

Los resultados de eliminación de E obtenidos están alineados con investigaciones previas. Así, Wang et al. (2019) reportaron una eliminación del 79% de E empleando *Haematococcus pluvialis*, *Selenastrum capricornutum*, y *S. quadricauda* individualmente en un periodo de 10 días con una concentración inicial de 5 ppm [398]. Además, Ruksrithong et al. (2019) demostraron una eliminación del 91% de E por *S. obliquus* y del 52% por *C. vulgaris* en 5 días, partiendo de una concentración entre 1,0 y 5,0  $\mu\text{g E/L}$  [261]. En este último trabajo, *Scenedesmus* eliminó más E en comparación con *C. vulgaris*, lo contrario a lo obtenido en este estudio. Estas discrepancias pueden deberse a las diferencias en el método de cultivo y la composición de las aguas residuales sintéticas empleadas. Estos autores emplearon un proceso de cultivo continuo, donde los reactores se alimentaban diariamente, proporcionando un entorno más estable y un suministro constante de nutrientes, lo que podría mejorar el rendimiento de *Scenedesmus* sobre *C. vulgaris*.

En la Tabla 4 - 20 se presenta un resumen de los resultados de degradación finales alcanzados para los compuestos de la familia de los parabenos en este estudio y en literatura.

Tabla 4 - 20. Porcentajes de eliminación final a 7 días de los parabenos con *Scenedesmus* sp. y *C. vulgaris* y comparación con resultados de bibliografía. Los errores representan la  $\pm$  desviación estándar de la media ( $n=3$ ).

| Especie                                                                                                                    | MeP              | PrP              | BuP              | Ref.         |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------------|------------------|------------------|--------------|
| <i>Scenedesmus</i> sp.                                                                                                     | 100,0 $\pm$ 0,0% | 99,4 $\pm$ 1,1%  | 99,2 $\pm$ 1,5%  | Este estudio |
| <i>C. vulgaris</i>                                                                                                         | 100,0 $\pm$ 0,0% | 100,0 $\pm$ 0,0% | 100,0 $\pm$ 0,0% |              |
| <i>C. reinhardtii</i>                                                                                                      | 100,0%           | 100,0%           |                  |              |
| <i>S. obliquus</i>                                                                                                         | 100,0%           | 100,0%           |                  |              |
| <i>C. pyrenoidosa</i>                                                                                                      | 100,0%           | 100,0%           |                  |              |
| <i>C. vulgaris</i>                                                                                                         | 100,0%           | 100,0%           |                  | [390]        |
| <i>Tetradescmus obliquus</i> , <i>C. vulgaris</i> , <i>Pseudanabaena</i> sp., <i>Scenedesmus</i> sp. y <i>Nitzscha</i> sp. |                  | 89,0%            |                  | [399]        |
| <i>C. vulgaris</i>                                                                                                         | 33,0-14,0%       |                  |                  | [316]        |
| Perifiton                                                                                                                  |                  |                  | 100,0%           | [400]        |

Comparar los resultados obtenidos con bibliografía es complejo debido a la heterogeneidad de las condiciones de cultivo y el gran efecto de las mismas en la eliminación de CDEs. Sin embargo, se puede observar que los valores de eliminación obtenidos para estos compuestos (100% en la mayoría de los casos) están dentro del mismo rango que los descritos previamente por otros autores. Así, Zhou et al. (2014) alcanzaron un 100% de eliminación de MeP y PrP utilizando diferentes especies de microalgas [390]. Además, Ruas et al (2020) lograron una eliminación aproximada del 89% de 300 ng PrP/L iniciales empleando un fotobiorreactor anóxico-anaerobio con un consorcio de *Tetradescmus obliquus*, *C. vulgaris*, *Pseudanabaena* sp., *Scenedesmus* sp. y *Nitzscha* sp. [399]. Sin embargo, las concentraciones utilizadas por estos autores son considerablemente más bajas que las empleadas en este estudio. Cuando se utilizaron concentraciones más altas de parabenos, solo se obtuvieron un 33% y un 14% de eliminación de MeP utilizando *C. vulgaris*, con concentraciones iniciales de 0,8 y 8,0 mg MeP/L, respectivamente. Dado que no se han encontrado estudios previos sobre la eliminación de BuP con microalgas, los resultados obtenidos en este trabajo se compararon con los obtenidos por Song et al. (2017), empleando perifiton, un agregado de organismos formado principalmente por bacterias y microalgas. Estos autores obtuvieron una eliminación total de BuP en un periodo de 4 días cuando la concentración de partida era de 10  $\mu$ g BuP/L [400].

En la Tabla 4 - 21 se recogen los resultados de degradación finales alcanzados para BP, BPA y E en este estudio y en literatura. Debido a la escasez de literatura sobre la eliminación de BP empleando microalgas, los resultados obtenidos se compararán con los de la eliminación de moléculas similares, como BP-3 y BP-4. Como se muestra en la Tabla 4 - 21, los resultados de degradación obtenidos en este estudio son superiores a los alcanzados en la bibliografía con la que se comparan. Lee et al. (2020) encontraron que *S. obliquus* eliminó entre el 23,3% y 28,5% de BP-3 en un

periodo de 10 días de cultivo, con concentraciones iniciales entre 0,1 y 3 mg BP-3/L [401]. El máximo de eliminación de BP-3, del 58,4%, se logró con el alga verde *Chlamydomonas reinhardtii* en 10 días y con una concentración inicial de 0,01 µg BP-3/L, disminuyendo este porcentaje de degradación a medida que aumentaba la concentración de este compuesto [402].

Tabla 4 - 21. Porcentajes de eliminación final a 7 días de BP, BPA y E con *Scenedesmus* sp. y *C. vulgaris* y comparación con resultados de bibliografía. Los errores representan la  $\pm$  desviación estándar de la media (n=3).

| Especie                          | BP                      | BPA             | E               | Ref.         |
|----------------------------------|-------------------------|-----------------|-----------------|--------------|
| <i>Scenedesmus</i> sp.           | 85,6 $\pm$ 9,0%         | 81,8 $\pm$ 6,3% | 67,0 $\pm$ 0,6% | Este estudio |
| <i>C. vulgaris</i>               | 62,1 $\pm$ 9,1%         | 89,9 $\pm$ 2,0% | 83,0 $\pm$ 2,0% |              |
| <i>S. obliquus</i>               | 23,3-28,5% <sup>1</sup> |                 |                 | [401]        |
| <i>Chlamydomonas reinhardtii</i> | 58,4% <sup>1</sup>      |                 |                 | [402]        |
| <i>C. vulgaris</i>               | 14,0% <sup>2</sup>      |                 |                 | [403]        |
| <i>Chlorella pyrenoidosa</i>     |                         | 20,0-43,0%      |                 | [221]        |
| <i>C. mexicana</i>               |                         | 39,0%           |                 | [393]        |
| <i>C. vulgaris</i>               |                         | 28,0%           |                 |              |
| <i>S. obliquus</i>               |                         |                 | 91,0%           | [261]        |
| <i>C. vulgaris</i>               |                         |                 | 52,0%           |              |

<sup>1</sup>BP-3

<sup>2</sup>BP-4

Respecto a otros trabajos que emplearon la misma concentración inicial de contaminante (1mg BP-4/L) usando *C. vulgaris* [403] se puede observar que los valores de eliminación de BP obtenidos fueron claramente inferiores (14,0%) respecto a los obtenidos en este estudio. De manera similar a la eliminación de BP, los resultados finales de eliminación de BPA presentados en la Tabla 4 - 21 fueron superiores a los reportados previamente por otros autores. Así, Fu et al (2023) lograron eliminaciones del 20,0%, 46,4%, 42,9% y 43,0% con *Chlorella pyrenoidosa* en 120 horas de cultivo, utilizando concentraciones de BPA de 2,0, 4,0, 6,0 y 8,0 mg BPA/L [221]. Otros estudios lograron eliminar un 39,0% y un 28,0% en 10 días, empleando las microalgas *C. mexicana* y *C. vulgaris*, respectivamente, partiendo de una concentración inicial de 1 mg BPA/L [393]. Finalmente, los porcentajes de eliminación de E obtenidos son consistentes con estudios previos. Así existen estudios en los que se ha logrado la eliminación del 91,0% y el 52,0% de E empleando *S. obliquus* y *C. vulgaris*, respectivamente [261]. Por otro lado, Wang et al. (2019) también reportaron eliminaciones de E superiores al 80,0% [398].

A la vista de los resultados obtenidos en este estudio, queda demostrado el potencial de las especies *Scenedesmus* sp. y *C. vulgaris* para eliminar

simultáneamente y con alta eficacia diferentes tipos de CDEs presentes en las aguas residuales, obteniendo, en general, valores de eliminación más altos que los reportados previamente en la literatura.

### A) Estudio cinético del proceso

Para cuantificar la velocidad de eliminación de los contaminantes, se calcularon las constantes cinéticas a partir de las curvas de degradación, suponiendo una cinética de pseudo-primer orden. Además, se estimó el tiempo de vida media, un parámetro crucial en la evaluación de riesgos de estos compuestos. En cuanto a los parabenos, la Tabla 4 - 22 muestra que, en general, la velocidad de degradación es mayor en presencia de microalgas (experimentos LOM) en comparación con las condiciones abióticas (experimentos O y LO), siendo *C. vulgaris* más eficaz que *Scenedesmus* sp.. Así, como puede verse en la Tabla 4 - 23, el tiempo de vida media de estos compuestos en condiciones abióticas es muy elevado. Las mayores velocidades de degradación para BP se observaron en condiciones abióticas, como se mencionó previamente, lo que refuerza la teoría de que esta es su principal vía de eliminación. Además, estas condiciones (experimentos O y LO) son aquellas en las que el tiempo de vida media de BP es más bajo (Tabla 4 - 23). Considerando la presencia de microalgas, *Scenedesmus* sp. es la especie que produce una mayor velocidad de eliminación para BP, con un tiempo de vida media muy similar al obtenido en condiciones de oxidación. En cuanto a la degradación de BPA, la Tabla 4 - 22 muestra que las velocidades de degradación más altas se obtienen en presencia de microalga, siendo *Scenedesmus* sp. la más rápida en su eliminación y presentando un tiempo de vida media casi la mitad que con *C. vulgaris*. Finalmente, en el caso de la eliminación de E, la mayor velocidad de degradación se observa en presencia de *C. vulgaris*, seguida de la degradación abiótica en presencia de oxígeno y la biodegradación con *Scenedesmus* sp (Tabla 4 - 22). Esta capacidad de *C. vulgaris* para eliminar E se refleja también en el tiempo de vida media, que es menos de la mitad respecto al resto de los experimentos (Tabla 4 - 23).

Tabla 4 - 23, reduciéndose drásticamente en presencia de ambas microalgas.

Tabla 4 - 22. Constantes de degradación (*k*) estimadas para la degradación abiótica y biodegradación de CDEs empleando una cinética de pseudo-primer orden.

| CDEs | $k_o$ ( $h^{-1}$ ) ( $R^2$ ) | $k_{Lo}$ ( $h^{-1}$ ) ( $R^2$ ) | $k_{LOM}$ ( $h^{-1}$ ) ( $R^2$ ) |                             |
|------|------------------------------|---------------------------------|----------------------------------|-----------------------------|
|      |                              |                                 | <i>Scenedesmus</i> sp.           | <i>C. vulgaris</i>          |
| MeP  | $1,3 \cdot 10^{-3}$ (0,868)  | $1,1 \cdot 10^{-3}$ (0,841)     | $9,0 \cdot 10^{-2}$ (0,983)      | $3,8 \cdot 10^{-1}$ (0,928) |
| PrP  | $7,0 \cdot 10^{-4}$ (0,831)  | $1,8 \cdot 10^{-3}$ (0,852)     | $5,7 \cdot 10^{-2}$ (0,968)      | $7,4 \cdot 10^{-2}$ (0,972) |
| BuP  | $2,9 \cdot 10^{-3}$ (0,951)  | $2,8 \cdot 10^{-3}$ (0,961)     | $5,4 \cdot 10^{-2}$ (0,982)      | $7,5 \cdot 10^{-2}$ (0,957) |
| BP   | $1,3 \cdot 10^{-2}$ (0,936)  | $1,6 \cdot 10^{-2}$ (0,958)     | $1,1 \cdot 10^{-2}$ (0,924)      | $6,0 \cdot 10^{-3}$ (0,901) |
| BPA  | $2,0 \cdot 10^{-3}$ (0,940)  | $1,1 \cdot 10^{-3}$ (0,956)     | $2,1 \cdot 10^{-2}$ (0,976)      | $1,3 \cdot 10^{-2}$ (0,815) |
| E    | $5,9 \cdot 10^{-3}$ (0,966)  | $3,1 \cdot 10^{-3}$ (0,954)     | $5,2 \cdot 10^{-3}$ (0,819)      | $9,9 \cdot 10^{-3}$ (0,805) |

Las mayores velocidades de degradación para BP se observaron en condiciones abióticas, como se mencionó previamente, lo que refuerza la teoría de que esta es su principal vía de eliminación. Además, estas condiciones (experimentos O y LO) son aquellas en las que el tiempo de vida media de BP es más bajo (Tabla 4 - 23). Considerando la presencia de microalgas, *Scenedesmus* sp. es la especie que produce una mayor velocidad de eliminación para BP, con un tiempo de vida media muy similar al obtenido en condiciones de oxidación. En cuanto a la degradación de BPA, la Tabla 4 - 22 muestra que las velocidades de degradación más altas se obtienen en presencia de microalga, siendo *Scenedesmus* sp. la más rápida en su eliminación y presentando un tiempo de vida media casi la mitad que con *C. vulgaris*. Finalmente, en el caso de la eliminación de E, la mayor velocidad de degradación se observa en presencia de *C. vulgaris*, seguida de la degradación abiótica en presencia de oxígeno y la biodegradación con *Scenedesmus* sp (Tabla 4 - 22). Esta capacidad de *C. vulgaris* para eliminar E se refleja también en el tiempo de vida media, que es menos de la mitad respecto al resto de los experimentos (Tabla 4 - 23).

Tabla 4 - 23. Tiempos de vida medios ( $t_{1/2}$ ) estimados para la degradación abiótica y biodegradación de CDEs.

| CDEs | $t_{1/2}$ O (h) | $t_{1/2}$ LO (h) | $t_{1/2}$ LOM (h)      |                    |
|------|-----------------|------------------|------------------------|--------------------|
|      |                 |                  | <i>Scenedesmus</i> sp. | <i>C. vulgaris</i> |
| MeP  | 533,19          | 630,13           | 7,70                   | 1,83               |
| PrP  | 990,21          | 385,08           | 12,16                  | 9,33               |
| BuP  | 239,02          | 247,55           | 12,84                  | 9,21               |
| BP   | 52,12           | 42,52            | 66,01                  | 115,52             |
| BPA  | 346,57          | 630,13           | 33,16                  | 52,51              |
| E    | 117,48          | 223,60           | 133,30                 | 70,01              |

## B) Análisis de los productos de degradación obtenidos

Por último, para hacer el seguimiento de la evolución de la degradación de los distintos contaminantes mostrada previamente, se tomaron muestras diarias de los experimentos abióticos y en presencia de microalga, las cuales fueron analizadas mediante HPLC utilizando los métodos cromatográficos desarrollados previamente. Los cromatogramas fueron registrados a las longitudes de onda de 254 nm y 210 nm, según el método aplicado.

En la Figura 4 - 35 se presentan los cromatogramas obtenidos a 254 nm mediante el método cromatográfico 1 (isocrático). Los picos observados en los tiempos de retención de 4,2 minutos, 6,3 minutos y 10,2 minutos se corresponden con PrP, BuP y BP, respectivamente. En todos los experimentos se detectó un pico adicional alrededor de los 3,35 minutos, identificado a partir de este punto como *producto A*. Dado que este pico aparece en todos los experimentos, se deduce que corresponde a un producto de degradación abiótica de alguno de los compuestos susceptibles a este tipo de transformación, como BP o E. En los experimentos realizados en

presencia de microalgas (Figura 4 - 35 (c) y (d)), se detectó un pico adicional a 2,84 minutos, denominado en adelante *producto B*. Además, en presencia de *Scenedesmus* sp., se observó la aparición del *producto C* a partir del tercer día, con un tiempo de retención 2,63 minutos. Con *C. vulgaris* se detectó un pico en el mismo tiempo de retención (2,63 minutos), identificado como *producto D*, a partir del segundo día.

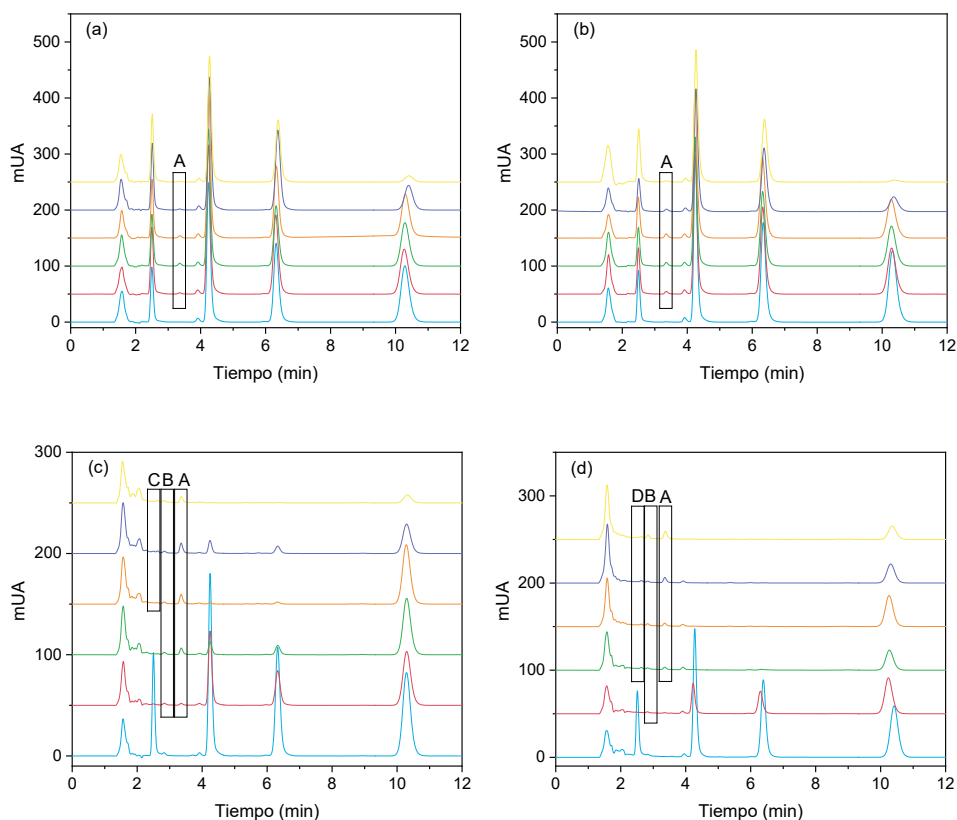


Figura 4 - 35. Cromatogramas a 254 nm para el método isocrático de los experimentos O (a), LO (b), LOM con *Scenedesmus* sp. (c) y LOM con *C. vulgaris* (d) para los días 0 (azul), 1 (rojo), 2 (verde), 3 (naranja), 4 (morado) y 7 (amarillo).

Con el fin de realizar un análisis cualitativo de los productos de degradación detectados cromatográficamente, se presentan sus espectros UV-visible en la Figura 4 - 40. Esta información espectral permite identificar de forma tentativa los cromóforos presentes en las moléculas, ya que distintos grupos funcionales presentan máximos de absorción ( $\lambda_{\max}$ ) característicos asociados a transiciones electrónicas específicas, como  $\pi \rightarrow \pi^*$  o  $n \rightarrow \pi^*$  [404].

Los productos A, C y D (Figura 4 - 36 (a), (c) y (d)) presentaron espectros UV-visible similares, con  $\lambda_{\max}$  entre 210 y 220 nm, región del espectro UV-visible en la que se observan transiciones electrónicas  $\pi \rightarrow \pi^*$  común sistemas con electrones

deslocalizados, como anillos aromáticos o dobles enlaces [405]. Asimismo, el hombro que aparece en la región 240-260 nm es típico de sistemas con carbonilos conjugados y el hombro en torno a 280 nm suele estar relacionado con transiciones  $n \rightarrow \pi^*$ , asociados a grupos carbonilo conjugados con sistemas aromáticos, como aldehídos o cetonas aromáticas [404,405]. Por otro lado, el espectro del producto B (Figura 4 - 36 (b)) presentó un máximo de absorción intenso en torno a 240 nm y un hombro menos definido alrededor de los 280 nm, lo que indica una estructura con conjugación moderada y presencia de grupos funcionales oxigenados. La banda centrada en 240 nm es característica de compuestos que contienen grupos carbonilo conjugados o anillos aromáticos sustituidos y el hombro a 280 nm refuerza la hipótesis de un grupo carbonilo presente en la molécula, (aldehído o cetona conjugada con un sistema aromático).

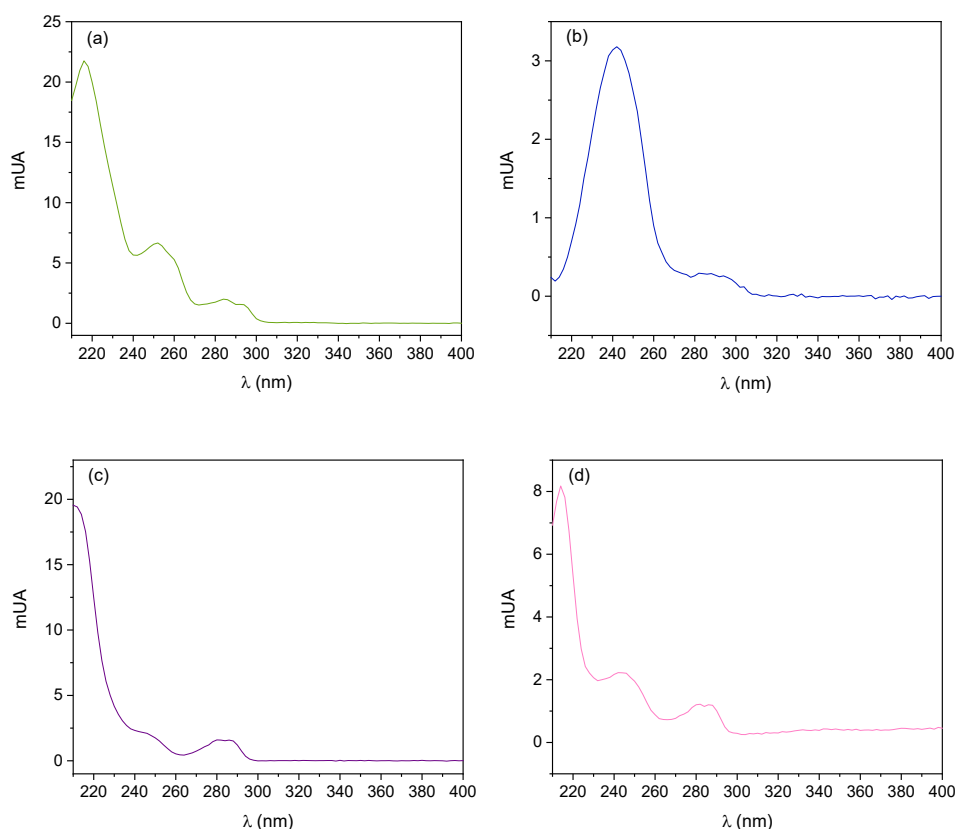


Figura 4 - 36. Espectros UV- visible de: (a) el producto A, (b) el producto B, (c) el producto C y (d) el producto D.

En la Figura 4 - 37 se observan los cromatogramas obtenidos a 210 nm mediante el método cromatográfico 1 (isocrático). Los picos observados a 3,9 minutos, 4,2 minutos, 5,9 minutos, 6,3 minutos y 10,2 minutos se corresponden con BPA, PrP, E, BuP y BP, respectivamente. De nuevo, se detectó la presencia del *producto A* en todos

los experimentos. Además, con excepción de los experimentos LOM con *C. vulgaris* (Figura 4 - 37 (d)), se identificó un nuevo *producto de degradación E*, con un tiempo de retención aproximado de 3,65 minutos. No obstante, la baja intensidad del pico correspondiente a este producto impidió la obtención de su espectro UV-visible. En los experimentos realizados con *Scenedesmus* sp. (Figura 4 - 37 (c)) se encontraron cinco productos de degradación. Tres de ellos se asociaron con los ya mencionados *productos A, C y E*, mientras que los otros dos correspondieron a picos con tiempos de retención de 2,47 minutos (*producto F*) y 5,39 minutos (*producto G*). Por otro lado, en los experimentos con *C. vulgaris* (Figura 4 - 37 (d)) se detectaron únicamente tres productos de degradación: el *producto A*, el *producto G* (también observados con *Scenedesmus* sp.) y un nuevo pico con un tiempo de retención de 2,62 minutos, identificado como *producto H*.

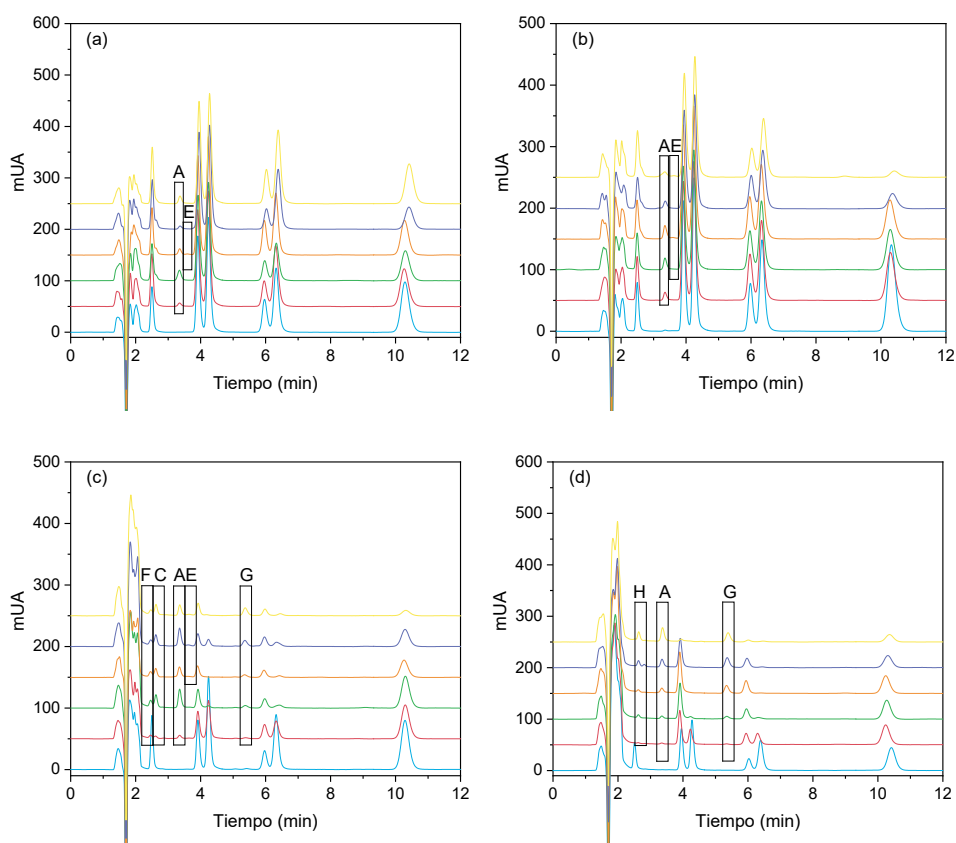


Figura 4 - 37. Cromatogramas a 210 nm para el método isocrático de los experimentos O (a), LO (b), LOM con *Scenedesmus* sp. (c) y LOM con *C. vulgaris* (d) para los días 0 (azul), 1 (rojo), 2 (verde), 3 (naranja), 4 (morado) y 7 (amarillo).

En la Figura 4 - 38 se agrupan los espectros UV-visible de los *productos F, G y H*. Los dos primeros presentaron unos espectros UV-visible con características muy similares, con dos hombros. El primero, situado a 230 nm puede corresponderse con

un anillo aromático; y el segundo, situado a 280 nm, como se comentó antes, puede atribuirse a un grupo carbonilo conjugado. Además, el *producto G* comparte espectro UV-visible con el *producto B*, caracterizado por un máximo de absorción intenso en torno a 240 nm y un hombro amplio en la región de 280 nm.

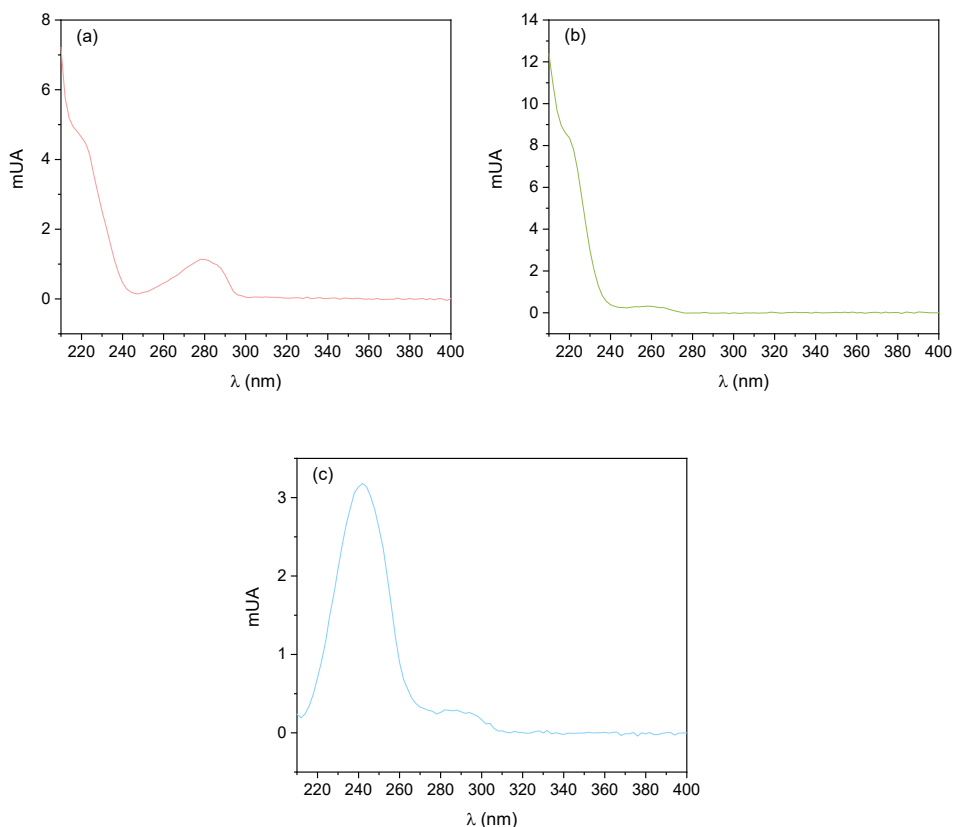


Figura 4 - 38. Espectros UV- visible de: (a) el producto F, (b) el producto G y (c) el producto H.

Finalmente, la Figura 4 - 39 muestra los cromatogramas obtenidos a 254 nm con el método cromatográfico 2 (en gradiente) para los experimentos abióticos (O y LO) y aquellos realizados en presencia de microalga (experimentos LOM). El pico observado en el tiempo de retención 2,1 min se corresponde con el MeP, mientras que el pico que aparece alrededor del tiempo de retención de 3,28 minutos no coincide con ninguno de los CDEs analizados, por lo que se atribuye a un producto de degradación, denominado partir de este punto como *producto I*. Este producto fue detectado desde el día 1 en los experimentos abióticos y a partir del día 2 en los experimentos con microalgas. Su presencia en todos los experimentos sugiere que probablemente se origine a partir de la degradación de BP o E, ya que fueron los únicos compuestos que presentaron degradación abiótica. Por otro lado, en los experimentos LOM se detectaron más productos de degradación. Concretamente, al emplear *Scenedesmus* sp., se identificaron dos picos adicionales: uno a 1,64

minutos (*producto J*) detectado desde el día 1 y otro a 2,07 minutos (*producto K*) presente a partir del día 3. En el caso de *C. vulgaris*, se observaron picos adicionales a 2,05 (*producto M*) y 2,36 minutos (*producto L*) el día 7.

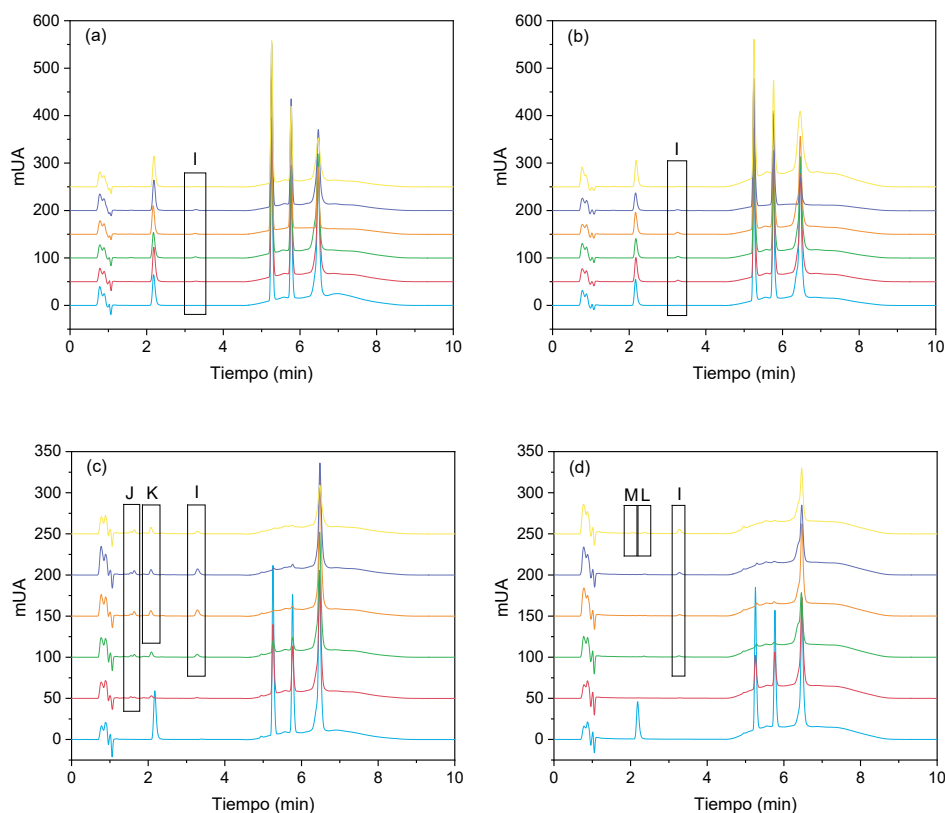


Figura 4 - 39. Cromatogramas a 254 nm para el método en gradiente de los experimentos O (a), LO (b), LOM con *Scenedesmus* sp. (c) y LOM con *C. vulgaris* (d) para los días 0 (azul), 1 (rojo), 2 (verde), 3 (naranja), 4 (morado) y 7 (amarillo).

Los *productos I* (Figura 4 - 40 (a)) y *L* (Figura 4 - 40 (d)) presentaron espectros UV similares a los ya comentados de los *productos A, C y D*, con un máximo de absorción intenso en la región de 210–220 nm, acompañado de dos hombros secundarios: uno entre 240–260 nm y otro en torno a 280 nm. Por su parte, el *producto J* (Figura 4 - 40 (b)) presenta un perfil menos definido en comparación con los *productos I y L*, ya que no se observó un máximo de absorción claramente marcado, aunque presenta dos hombros. Además, su espectro UV-visible tenía características muy similares a las de los *productos F, G y H*, marcado por la presencia de un hombro en torno a 230 nm y un pico de absorción menos intenso en la región de 270–280 nm. El *producto K* (Figura 4 - 40 (c)) presentó un único máximo aproximadamente a 250 nm que, como se ha comentado previamente, es común en compuestos que contienen o anillos aromáticos poco sustituidos o grupos carbonilo conjugados. Finalmente, el *producto M* (Figura 4 - 40 (e)) presentó una absorción intensa en torno a 210 nm (típica de anillos

aromáticos), un hombro secundario a 230 nm y un pico amplio centrado entre 275 y 280 nm (grupos carbonilo conjugados).

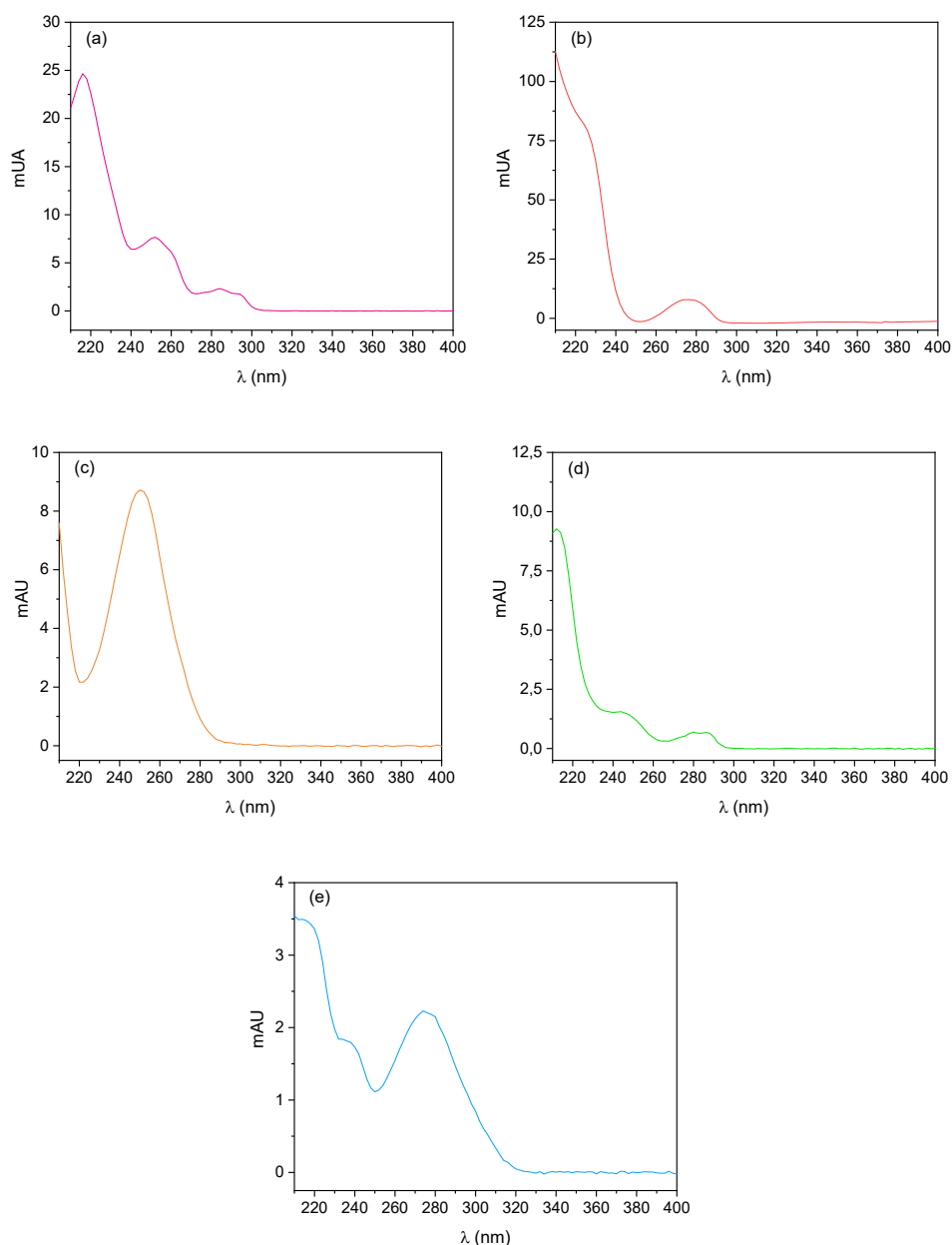


Figura 4 - 40. Espectros UV- visible de: (a) el producto I, (b) el producto J, (c) el producto K, (d) el producto L y (e) el producto M.

En conjunto, el análisis de todos estos espectros UV-visible de los productos de degradación sugiere que todos ellos comparten estructuras con cierto grado de conjugación, predominando grupos funcionales como carbonilos conjugados y

anillos aromáticos sustituidos, lo que indica que, a pesar de la transformación de los CDEs originales, sus productos conservan características estructurales similares a los mismos.

Una vez interpretados los espectros UV-visible de los productos de degradación detectados y consideradas las longitudes de onda a las que absorben, se procedió a su comparación con productos de degradación descritos en la bibliografía.

En el caso de los parabenos, Chang et al. (2023) identificaron como productos de degradación del MeP, en presencia de microalgas, moléculas como benzoato de metilo, ácido benzoico, catecol y ácido dihidroxibenzoico [264]. Además, el ácido 4-hidroxibenzoico también es un metabolito de degradación común de los parabenos en aguas residuales [335]. Estas estructuras presentan grupos hidroxilo o carbonilo conjugados, lo que podría explicar los picos observados entre 240 y 280 nm en los espectros de varios productos analizados previamente.

En cuanto a las benzofenonas, ya se había comentado que la acción de las especies reactivas de oxígeno (ROS) puede inducir su degradación. Según estudios previos, las benzofenonas en presencia de radicales  $\cdot\text{OH}$  forman productos hidroxilados [406]. En este sentido, Zúñiga-Benítez et al. (2018) y Du et al. (2018) describieron que la benzofenona y la benzofenona con un grupo OH en la posición 1 o 2 (BP-1 y BP-2) generan productos hidroxilados tras la adición de  $\cdot\text{OH}$  a su estructura [407,408]. Por otro lado, los ROS también pueden atacar a los grupos carbonilo y formar estructuras más simples, como ácidos carboxílicos. Asimismo, Bubev et al. (2016) propusieron como vía de eliminación de las benzofenonas la formación de ácido benzoico y fenol [409]. Estos mecanismos de degradación son coherentes con los espectros UV-visible obtenidos para los productos encontrados, los cuales presentaron características asociadas a grupos funcionales como anillos aromáticos sustituidos (absorbancia a 210 nm), carbonilos conjugados (absorbancia entre 240 y 260 nm), fenoles (absorbancia alrededor de 270 nm [342]) o ácidos carboxílicos.

Respecto al bisfenol A, diversos estudios han descrito rutas de biodegradación algal o microbiana. He et al. (2022) propusieron una ruta completa de transformación del BPA por *Chlorella pyrenoidosa* (Figura 4 - 41) [410], mientras que Wang et al. (2017) documentaron la formación de metabolitos como 4-isopropanol-fenol o 4-isopropanol-benceno-1,2-diol en presencia de *Desmodesmus* sp. [411]. Además, Eltoukhy et al. (2022) observaron su transformación por la bacteria *Pseudomonas putida*, generando productos como 1,2 y 2,2-bis(4-hidroxifenil)-2-propanol, así como metabolitos más simples como 4-hidroxibenzaldehído, 4-hidroxibenzoato o 4-hidroxiacetofenona [412]. Estos compuestos presentan estructuras aromáticas sustituidas con grupos carbonilo, lo que es similar a los espectros observados en productos como el M.

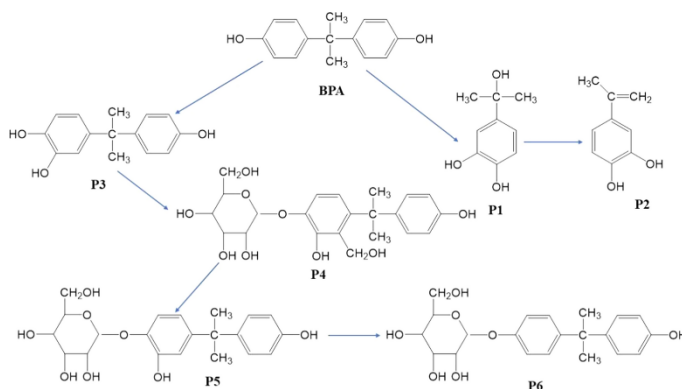


Figura 4 - 41. Vía propuesta por He et al. (2022) para la transformación de BPA por *C. pyrenoidosa* [410].

Por último, en relación con la E, se ha descrito su conversión en hidroxiestrone por hidroxilación del anillo aromático [413]. Además, Ibero et al. (2020) identificaron, tras su degradación con *Novosphingobium tardagens*, metabolitos como 4-hidroxiestrone o ácido piridinestrónico [414]. Ambos productos presentan estructuras con grupos funcionales conjugados, como anillos aromáticos hidroxilados y carbonilos, que justifican la absorción en las regiones espectrales observadas para los productos de degradación identificados en este estudio, lo que refuerza la hipótesis de que estos compuestos podrían corresponderse con metabolitos derivados de E.

En general, en los cromatogramas mostrados anteriormente, se ha podido observar que los productos de degradación presentes en los experimentos abióticos (O y LO) aparecían igualmente en los experimentos en presencia de microalga (LOM). Esto sugiere que, incluso en presencia de microalga, se produce una parte de degradación abiótica. Por otro lado, al comparar los cromatogramas obtenidos con *Scenedesmus* sp. y *C. vulgaris*, no se detectaron los mismos productos de degradación, lo que indica que la bioeliminación no sigue el mismo mecanismo. Esto podría deberse a la liberación de diferentes enzimas que no generan los mismos productos, así como la producción de distintos ROS o AEOM.

### C) Actividad enzimática

Como se comentó previamente, la biodegradación puede ser llevada a cabo por las microalgas a través de diversos mecanismos. Por una parte, esta puede ocurrir de forma intracelular, donde la eliminación de contaminantes se realiza gracias a la acción de diversas enzimas presentes en el interior de la célula. Por otra parte, también se ha descrito una biodegradación extracelular, influenciada por la presencia de sustancias poliméricas extracelulares (EPS), las propias enzimas extracelulares o la AEOM liberada por las células, que pueden favorecer la producción de radicales libres, así como por ROS. Dado que se observó una variabilidad en los productos de

degradación generados por cada especie de microalga, se estimó la fracción de contaminantes eliminada exclusivamente por la acción de las enzimas extracelulares, expresada en unidades de actividad enzimática (UAE). Para ello, se repitieron los experimentos LOM, recogiendo diariamente 30 mL del sobrenadante donde se encontraban las enzimas liberadas por cada especie-. Dicho sobrenadante fue filtrado, se le añadieron 30 ppm de cada contaminante y se incubó en oscuridad durante 24 horas. Transcurrido este tiempo, se determinó la concentración de CDEs presente, y se estimó por diferencia la cantidad de contaminante eliminada por acción enzimática. Los resultados así obtenidos se representan en la Figura 4 - 42.

En la Figura 4 - 42 (a), (b) y (c) se muestra la evolución de la actividad enzimática durante la eliminación de MeP, PrP y BuP, respectivamente. Para el MeP, la actividad enzimática inicial fue de 0,31  $\mu\text{mol/g biomasa}\cdot\text{h}$  con *Scenedesmus* sp. y de 0  $\mu\text{mol/g biomasa}\cdot\text{h}$  con *C. vulgaris*, alcanzando un máximo el segundo día con *Scenedesmus* sp. (5,15  $\mu\text{mol/g biomasa}\cdot\text{h}$ ) y el tercer día con *C. vulgaris* (1,07  $\mu\text{mol/g biomasa}\cdot\text{h}$ ) y disminuyendo posteriormente en ambos casos. En general, la actividad enzimática con *Scenedesmus* sp. fue significativamente mayor que con *C. vulgaris* el segundo día ( $p<0,05$ ), sin observarse diferencias significativas en los días posteriores. Con respecto al PrP (Figura 4 - 42 (b)), la actividad enzimática inicial fue también significativamente superior con *Scenedesmus* sp. (3,54  $\mu\text{mol/g biomasa}\cdot\text{h}$ ) frente a *C. vulgaris* (0,69  $\mu\text{mol/g biomasa}\cdot\text{h}$ ) ( $p<0,05$ ). En ambas especies se observó una tendencia muy similar, con un máximo el segundo día y un descenso posterior. Para BuP (Figura 4 - 42 (c)), la actividad enzimática fue significativamente mayor con *Scenedesmus* sp. durante los dos primeros días ( $p<0,05$ ), pero esta tendencia se revirtió el séptimo día, cuando *C. vulgaris* presentó valores significativamente más altos ( $p<0,05$ ). Finalmente, si se comparan estos resultados con las curvas de eliminación de los experimentos LOM (Figura 4 - 28 (a), (b) y (c)) se observa que los resultados obtenidos son coherentes, ya que la mayor liberación enzimática se da en los dos primeros días, coincidiendo con la eliminación total de los parabenos en este periodo. No obstante, en el caso del MeP con *C. vulgaris*, la eliminación completa se produjo incluso antes del primer día (Figura 4 - 28 (a)), mientras que la actividad enzimática medida con el sobrenadante de ese día fue nula (0  $\mu\text{mol/g biomasa}\cdot\text{h}$ ). Esto sugiere que, en este caso, podrían estar involucradas otras sustancias liberadas por la microalga, como ROS o AEOM, en la rápida degradación observada. Por ejemplo, Wu et al. (2021) observaron una eliminación completa de 17 $\beta$ -estradiol y 17 $\alpha$ -etinilestradiol en solo 1 día utilizando AEOM liberado por *C. vulgaris* y en 5 días al emplear AEOM procedente de *S. capricornutum*, partiendo de concentraciones iniciales de 3 mg/L de cada contaminante [397]. Además, Ge et al. (2009) reportaron una degradación del 18-20% para 17 $\alpha$ -etinilestradiol y del 16-36% para 17 $\beta$ -estradiol tras 4 horas empleando *C. vulgaris*, *Anabaena cylindrica* y *Microcystis aeruginosa* kutz, utilizando concentraciones iniciales de 8 mg/L, debido a la presencia de  $\cdot\text{OH}$  formado a partir de las sustancias secretadas por las algas [415].

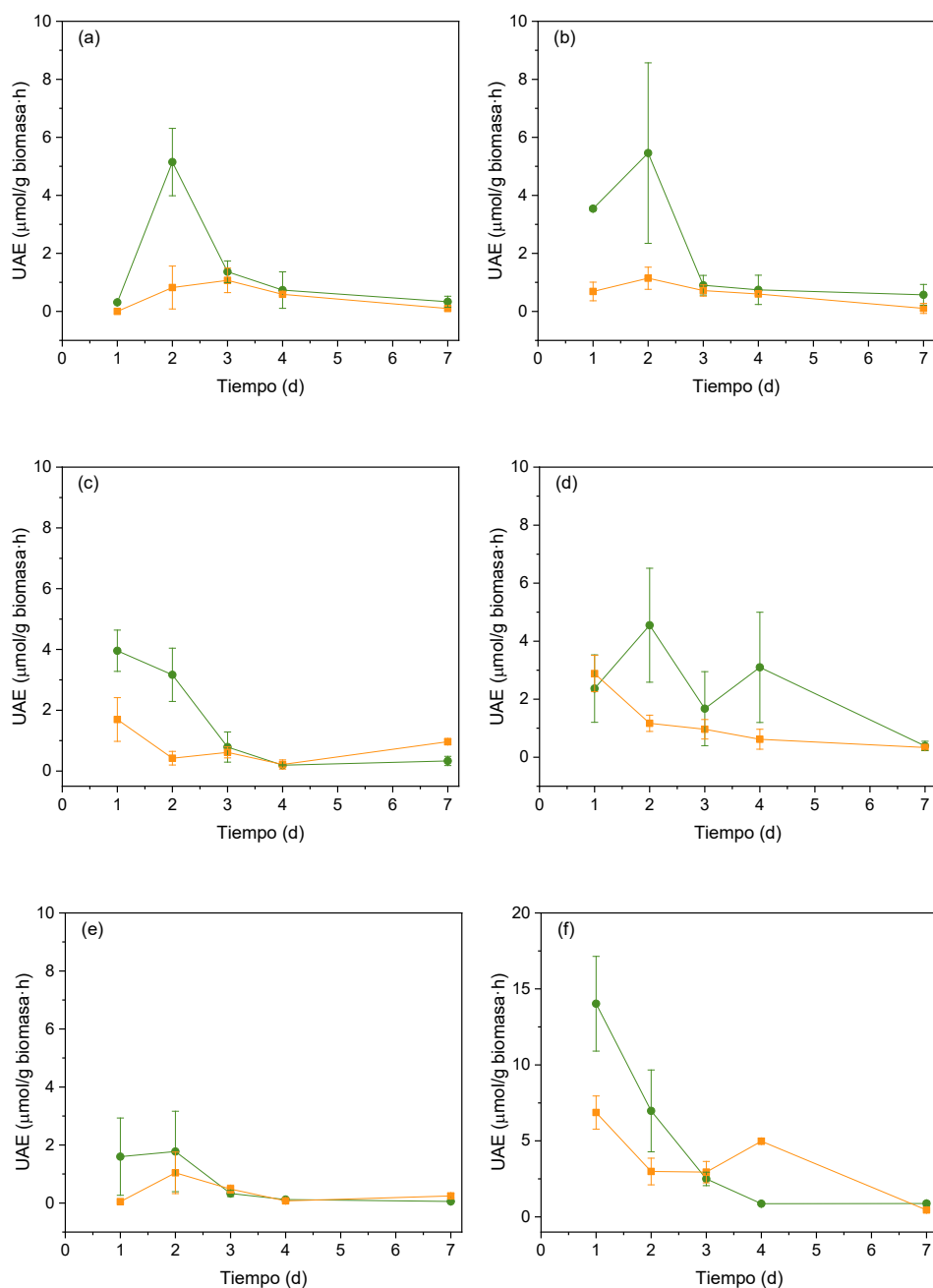


Figura 4 - 42. Actividad enzimática con *Scenedesmus sp.* (círculo verde) y con *C. vulgaris* (cuadrado naranja) de MeP (a), PrP (b), BuP (c), BP (d), BPA (e) y E (f). Las barras de error representan la  $\pm$  desviación estándar de la media ( $n=3$ ).

Respecto a la BP (Figura 4 - 42 (d)), no se observaron diferencias significativas ( $p>0,05$ ) a nivel estadístico en la actividad enzimática entre *Scenedesmus sp.* y *C. vulgaris*. Aunque se detectó cierta capacidad de degradación de la BP mediante las

enzimas liberadas por ambas especies, los resultados previos indicaban que la degradación abiótica constituía el mecanismo principal en la eliminación de este contaminante (Figura 4 - 29).

El BPA fue el compuesto que presentó la menor degradación enzimática para ambas especies, como se muestra en la Figura 4 - 42 (e). Además, no se observaron diferencias significativas ( $p > 0,05$ ) en la actividad enzimática entre *Scenedesmus* sp. y *C. vulgaris*. Este perfil de actividad enzimática no se corresponde con la tendencia de degradación del BPA observada en los experimentos LOM (Figura 4 - 30), donde *Scenedesmus* sp. eliminó la mayor parte del contaminante durante los dos primeros días, mientras que *C. vulgaris* lo hizo principalmente entre el cuarto y el séptimo día. Esta falta de correlación entre la actividad enzimática y la eliminación del compuesto sugiere, una vez más, que la biodegradación del BPA no está relacionada directamente con la acción enzimática extracelular, sino que podría deberse a la liberación de ROS o de AEOM por parte de las microalgas.

Finalmente, en el caso de la E (Figura 4 - 42 (f)), se encontró que la actividad enzimática fue superior con *Scenedesmus* sp. durante los primeros 2 días. Sin embargo, el cuarto día, la actividad enzimática resultó significativamente mayor con *C. vulgaris* ( $p < 0,05$ ), mientras que el tercer y séptimo día no se detectaron diferencias significativas entre ambas especies. Aunque se detectó actividad enzimática desde el primer día, los resultados de eliminación de E en los experimentos LOM (Figura 4 - 32) indicaron que, en ese momento, el mecanismo predominante era la degradación abiótica. La participación de la biodegradación comenzó a ser evidente a partir del segundo día con *Scenedesmus* sp., y entre los días 4 y 7 con *C. vulgaris*, coincidiendo con el máximo en la actividad enzimática para esta especie.

### 4.2.3. Estudio de los mecanismos de eliminación de CDEs

De la Figura 4 - 43 a la Figura 4 - 46 se muestran las contribuciones de las diferentes vías de eliminación (abiótica, bioadsorción, bioacumulación y bioeliminación) a 7 días para los contaminantes estudiados. Los resultados aparecen expresados como la cantidad de contaminante eliminada con respecto a su concentración inicial para cada experimento.

El principal mecanismo de eliminación para los parabenos empleando ambas especies de microalgas fue la bioeliminación (Figura 4 - 43 (a)-(f)). En particular, la bioeliminación de MeP con *Scenedesmus* sp. aumentó del 88,61% al 100,00% a lo largo de 7 días (Figura 4 - 43 (a)) mientras que con *C. vulgaris* se alcanzó el 100,00% desde el primer día (Figura 4 - 43 (b)). En el caso de PrP y BuP, la bioeliminación con *Scenedesmus* sp. pasó del 65,87% al 98,17% y del 71,28% al 99,16%, respectivamente, durante el mismo periodo. Con *C. vulgaris*, los valores aumentaron del 72,23% al 100% para PrP y del 67,73% al 100% para BuP.

Sin embargo, *Scenedesmus* sp. mostró un pequeño porcentaje de bioadsorción y bioacumulación para el MeP (Figura 4 - 43 (a)) y el PrP (Figura 4 - 43 (c)), tal y como se muestra en la Tabla 4 - 24. Así la contribución del mecanismo de adsorción siguió la misma tendencia en ambos compuestos, incrementándose inicialmente entre los días 1 y 3 (del 0,43 al 1,71% para el MeP y del 0,57 al 1,44% para el PrP), para posteriormente disminuir hasta el día 7, alcanzando menos del 0,04% para el MeP y el 0,64% para el PrP. Estudios previos sugieren que los parabenos pueden adherirse a la materia orgánica, existiendo una correlación positiva entre la bioadsorción y la hidrofobicidad de los compuestos [400]. Esto implicaría que, a mayor valor del coeficiente de partición octanol-agua ( $\log K_{ow}$ ), los contaminantes tendrían mayor afinidad por adherirse a la pared celular. Sin embargo, los resultados obtenidos no siguen esta tendencia, ya que, de ser así, los mayores porcentajes de bioadsorción deberían de haberse observado para el BuP, seguidos de del PrP y, finalmente, los más bajos para el MeP. El resultado obtenido es compatible con que el proceso de bioadsorción no es selectivo y, cuando hay más contaminantes en las aguas residuales, el proceso se ve afectado, saturándose los sitios libres de la pared celular con cualquiera de los compuestos y variando la velocidad de adsorción [416]. Por otro lado, la fracción bioacumulada del MeP creció durante los 4 primeros días, desde el 0,04-0,11% hasta el 0,88%, para luego desaparecer casi por completo el día 7 ( $<0,04\%$ ). En contraste, la bioacumulación del PrP mostró una tendencia creciente durante los 7 días, incrementándose desde menos del 0,005% hasta el 0,58%. Estos resultados sugieren que tanto el MeP como el PrP experimentan una difusión lenta hacia el interior de las células, y probablemente el MeP sufre biodegradación por las enzimas intracelulares. En el caso del BuP (Figura 4 - 43 (e)) la contribución de los mecanismos de bioadsorción y bioacumulación son despreciables, siendo menos del 0,08% del total de contaminante. La concentración de contaminantes detectada en ambos casos está por debajo del LOD.

Analizando los resultados de *C. vulgaris* se observa como la pared celular de esta especie no es capaz de adsorber parabenos (Figura 4 - 43 (b), (d) y (f)). En este sentido, Vale et al. (2022) reportó que la bioadsorción de MeP sobre *C. vulgaris* es despreciable debido a la hidrofobicidad que presenta su pared celular [316]. Este hecho concuerda con los resultados obtenidos, donde la fracción bioacumulada fue de menos del 0,05% para el MeP y el PrP ( $<\text{LOD}$ ) y de entre el 0,53 y el 0,11% para el BuP ( $\text{LOD-LOQ}$ ). Por otro lado, el mecanismo de bioacumulación también presentó contribuciones muy bajas, al igual que el mecanismo de bioadsorción.

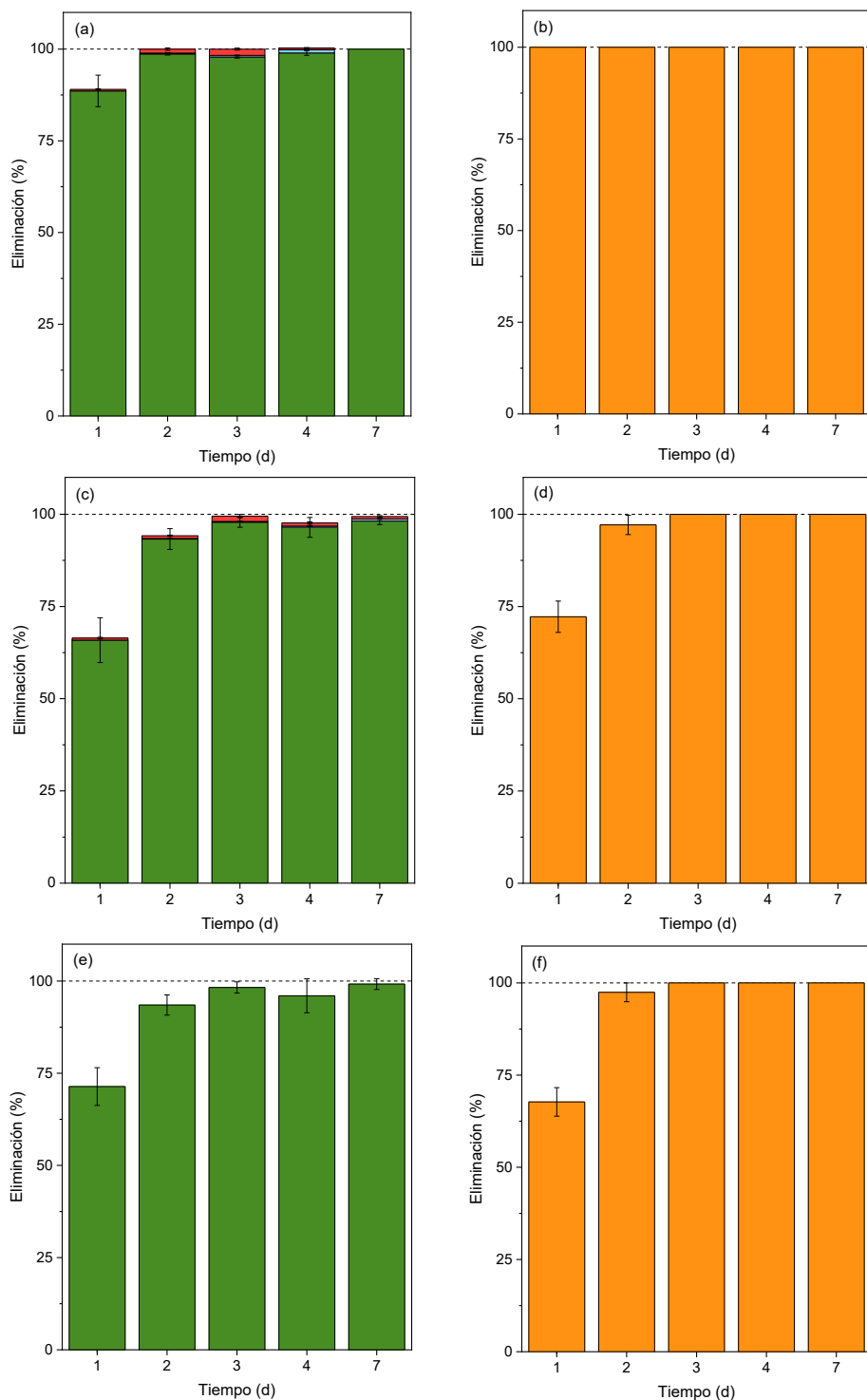


Figura 4 - 43. Contribución (%) de la bioadsorción (rojo), bioacumulación (azul) y biodegradación (*Scenedesmus* sp. verde y *C. vulgaris* naranja) en la eliminación del MeP, el PrP y el BuP con *Scenedesmus* sp. (a, c y e) y con *C. vulgaris* (b, d y f). Las barras de error representan la  $\pm$  desviación estándar de la media ( $n=3$ ).

Tal y como se recoge en literatura, cuando hay CDEs presentes en el interior de la célula, se puede activar un mecanismo de defensa contra el estrés oxidativo, lo que lleva a la formación de ROS en los orgánulos [266]. De acuerdo con algunos trabajos, no se observó una formación excesiva de ROS durante el crecimiento de *C. vulgaris* en presencia de 0,8 mg MeP/L durante 7 días, lo que refuerza la teoría de que los parabenos no se difunden en las células de esta especie [316]. Por lo tanto, la biodegradación fue la principal vía de degradación de los parabenos con *C. vulgaris*.

Tabla 4 - 24. Contribución (%) de la bioadsorción y la bioacumulación en la eliminación de parabenos con *Scenedesmus* sp. en 7 días. Los errores representan la  $\pm$  desviación estándar de la media ( $n=3$ ).

| Bioadsorción (%)   |                     |               |               |
|--------------------|---------------------|---------------|---------------|
| Tiempo (d)         | MeP                 | PrP           | BuP           |
| 1                  | 0,43±0,16           | 0,57±0,20     | <0,08% (<LOD) |
| 2                  | 1,09±0,34           | 1,26±0,87     |               |
| 3                  | 1,71±0,27           | 1,44±0,46     |               |
| 4                  | 0,45±0,14           | 0,85±0,29     |               |
| 7                  | <0,04 (<LOD)        | 0,64±0,25     |               |
| Bioacumulación (%) |                     |               |               |
| Tiempo (d)         | MeP                 | PrP           | BuP           |
| 1                  | 0,11-0,04 (LOQ-LOD) | <0,005 (<LOD) | <0,08 (<LOD)  |
| 2                  | 0,23±0,06           | 0,15±0,02     |               |
| 3                  | 0,43±0,08           | 0,20±0,06     |               |
| 4                  | 0,88±0,18           | 0,35±0,13     |               |
| 7                  | <0,04 (<LOD)        | 0,58±0,12     |               |

Analizando la contribución de los diferentes mecanismos de eliminación de BP se observó una notable degradación abiótica (Figura 4 - 44 (a) y (b)). En el caso de *Scenedesmus* sp., la degradación abiótica representó desde un 22,17% en el día 1 hasta un 84,37% al día 7 del total de BP eliminado (Figura 4 - 44 (a)). Con *C. vulgaris*, esta contribución aumentó del 22,08% al 57,20% en el mismo intervalo de tiempo (Figura 4 - 44 (b)). Estos resultados fueron extraídos de la Figura 4 - 29, donde las eliminaciones de BP obtenidas en condiciones abióticas (experimentos LO) no mostraron diferencias significativas con respecto a los experimentos con microalgas (experimentos LOM), independientemente de la especie utilizada ( $p>0,05$ ), excepto para *C. vulgaris* a 1 y 7 días, donde la degradación fue menor en presencia de microalga.

Por otro lado, en la Figura 4 - 44 (a) se puede observar que en el caso de *Scenedesmus* sp. se encontró una menor contribución del mecanismo de bioadsorción para la eliminación de BP que en el caso de *C. vulgaris* (Figura 4 - 44 (b)). Así, mientras que con *Scenedesmus* sp. la fracción bioadsorbida aumentó en los primeros 2 días y luego se mantuvo casi constante hasta el día 7, con *C. vulgaris* esta fracción mostró una tendencia creciente a lo largo de los 7 días, alcanzando un 4,4%

al final (Tabla 4 - 25). Como se observa en la Figura 4 - 44 (a) y (b) y se presenta en la Tabla 4 - 25, la fracción bioacumulada fue despreciable para ambas especies. En este sentido, en presencia de *Scenedesmus* sp. se obtuvo un valor por debajo de 0,09% (<LOD) durante los primeros 3 días, aumentando ligeramente a valores entre el 0,09 y 0,32% (valores entre el LOD y el LOQ). En el caso de *C. vulgaris*, se observó una tendencia similar, con una concentración por debajo de 0,12% el primer día, que aumentó hasta 0,53% a día 7. Tratar de comparar estos resultados con resultados bibliográficos previos sobre eliminación de BP es complicado debido a la escasez de estudios sobre este compuesto y su sensibilidad a la degradación abiótica según las condiciones de cultivo. Los compuestos más parecidos de los que existen resultados disponibles en la bibliografía son BP-3 y BP-4, para los cuales, Lee et al. (2020) alcanzaron un 97% de biodegradación partiendo de 0,5 ppm de BP-3 en 10 días empleando *S. obliquus*, atribuyendo el 3% a la degradación abiótica [401]. De manera similar, Huang et al. (2028) encontraron que la adsorción y absorción de BP-4 sobre la pared de *C. vulgaris* era despreciable, disminuyendo su concentración solo por biodegradación y alcanzando un 14% de degradación a partir de una concentración inicial de 1 mg BP-4/L en 13 días [403]. La menor degradación abiótica observada en la literatura en comparación con esta investigación es atribuible, principalmente, a diferencias en las condiciones de cultivo. Así, los cultivos de ambos trabajos se mantuvieron solo con agitación, sin aireación, lo que llevó a la ausencia de ROS derivados del oxígeno en el medio de cultivo, que promueven la eliminación de BP.

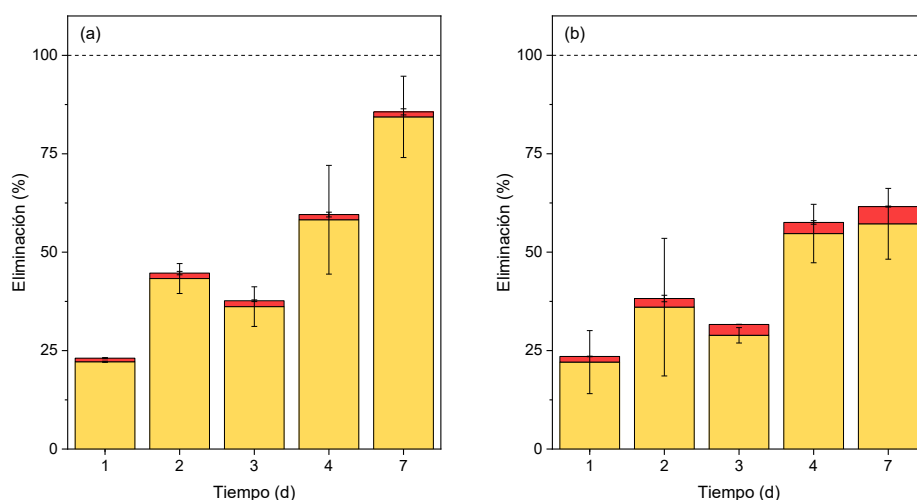


Figura 4 - 44. Contribución (%) de la degradación abiótica (amarillo), bioadsorción (rojo), bioacumulación (azul) y biodegradación (*Scenedesmus* sp. verde y *C. vulgaris* naranja) en la eliminación de BP con *Scenedesmus* sp. (a) y con *C. vulgaris* (b). Las barras de error representan la  $\pm$  desviación estándar de la media ( $n=3$ ).

Tabla 4 - 25. Contribución (%) de la bioadsorción y la bioacumulación en la eliminación de BP con *Scenedesmus* sp. y *C. vulgaris* en 7 días. Los errores representan la  $\pm$  desviación estándar de la media ( $n=3$ ).

| Tiempo<br>(d) | % Bioadsorción            |                              | % Bioacumulación        |                         |
|---------------|---------------------------|------------------------------|-------------------------|-------------------------|
|               | <i>Scenedesmus</i><br>sp. | <i>C.</i><br><i>vulgaris</i> | <i>Scenedesmus</i> sp.  | <i>C. vulgaris</i>      |
| 1             | 0,91 $\pm$ 0,14           | 1,43 $\pm$ 0,07              |                         | <0,12                   |
| 2             | 1,39 $\pm$ 0,43           | 2,19 $\pm$ 0,81              | <0,09(<LOD)             |                         |
| 3             | 1,49 $\pm$ 0,21           | 2,75 $\pm$ 0,03              |                         | 0,12-0,42 (LOD-<br>LOQ) |
| 4             | 1,32 $\pm$ 0,60           | 2,82 $\pm$ 0,45              | 0,09-0,32 (LOD-<br>LOQ) |                         |
| 7             | 1,28 $\pm$ 0,79           | 4,38 $\pm$ 0,11              |                         | 0,53 $\pm$ 0,03         |

En la Figura 4 - 45 se muestra la contribución de los diferentes mecanismos de eliminación para el BPA. Como se puede observar, el mecanismo de eliminación mayoritario para este compuesto empleando *Scenedesmus* sp. es la biodegradación (Figura 4 - 45 (a)), encontrándose una pequeña contribución de eliminación de BPA mediante otras vías (<1%), como se recoge en la Tabla 4 - 26. Con esta especie, se registraron valores de biodegradación comprendidos entre el 30,17% y el 81,81% entre los días 1 y 7 (Figura 4 - 45 (a)). Además, no se detectó BPA en el interior de las células, lo que indica que la fracción bioacumulada era despreciable, siendo menos del 0,06% (<LOD) durante los primeros 2 días y entre 0,52% y 0,06% (LOQ-LOD) en los últimos tres días.

Con *C. vulgaris*, tanto la bioadsorción como la biodegradación contribuyeron significativamente a la eliminación de BPA (Figura 4 - 45 (b)). Ambas vías de eliminación presentaron una contribución similar durante los primeros tres días, observándose una biodegradación del 5,17% el día 1, que aumentó progresivamente hasta alcanzar el 13,32% el día 3. A partir del cuarto día, la biodegradación se convirtió en el mecanismo predominante, llegando al 83,93% el séptimo día. El porcentaje de bioacumulación comenzó entre 0,08 y 0,69% (LOD-LOQ), aumentó hasta el 0,83% el día 2, y luego disminuyó nuevamente hasta los valores iniciales el día 7 (Tabla 4 - 26).

Al comparar los resultados obtenidos en esta tesis con los reportados en la literatura, se observan diferencias significativas, destacando en general un mayor porcentaje de biodegradación en el presente estudio. Así, Ben Ouada et al. (2018) encontraron que la bioacumulación, la bioadsorción y la biodegradación representaron el 1,30%, 11,60% y 40,00% de la eliminación total, respectivamente, en 5 días empleando *Picocystis*, una *Chlorophyta* alcalifílica, partiendo de una concentración inicial de 25 mg BPA/L [417]. Estos autores reportaron valores más elevados de bioacumulación y bioadsorción en comparación con los obtenidos en este trabajo, específicamente un máximo de bioacumulación de 0,52% con *Scenedesmus* sp. y 0,69% con *C. vulgaris* y menos del 0,06% de bioadsorción con *Scenedesmus* sp. y 5,95% con *C. vulgaris*. Sin embargo, la biodegradación fue menor en su estudio (40,00%), en comparación con los valores obtenidos en esta tesis, que

alcanzaron el 81,81% con *Scenedesmus* sp. y el 83,93% con *C. vulgaris*. Por otro lado, Ji et al. (2014) obtuvieron una contribución de la biodegradación alrededor del 25,00% de la eliminación total utilizando *C. mexicana* y *C. vulgaris* después de 10 días con una concentración inicial de 1 mg BPA/L [393]. En comparación, el porcentaje de biodegradación obtenido con *C. vulgaris* en este estudio fue más alto, a pesar de emplear tiempos más cortos.

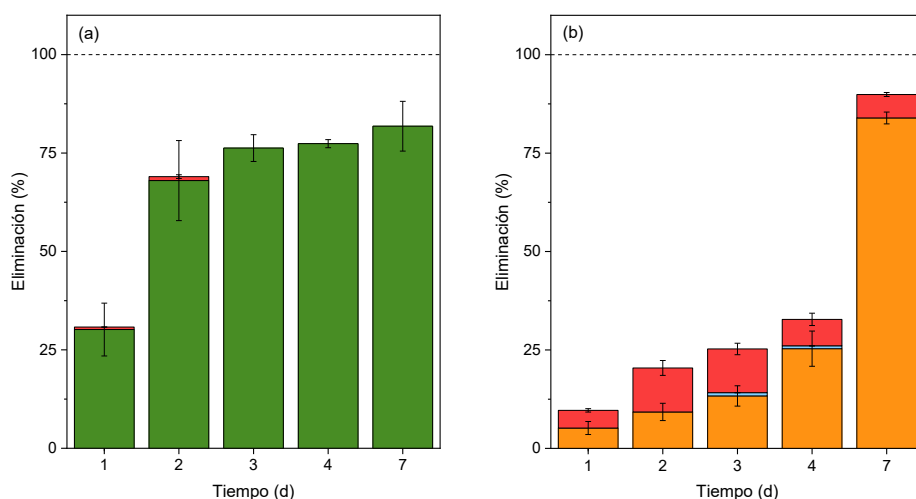


Figura 4 - 45. Contribución (%) de la degradación abiótica (amarillo), bioadsorción (rojo), bioacumulación (azul) y biodegradación (*Scenedesmus* sp. verde y *C. vulgaris* naranja) en la eliminación de BPA con *Scenedesmus* sp. (a) y con *C. vulgaris* (b). Las barras de error representan la  $\pm$  desviación estándar de la media ( $n=3$ ).

Tabla 4 - 26. Contribución (%) de la bioadsorción y la bioacumulación en la eliminación de BPA con *Scenedesmus* sp. y *C. vulgaris* en 7 días. Los errores representan la  $\pm$  desviación estándar de la media ( $n=3$ ).

| Tiempo (d) | % Bioadsorción         |                    | % Bioacumulación       |                     |
|------------|------------------------|--------------------|------------------------|---------------------|
|            | <i>Scenedesmus</i> sp. | <i>C. vulgaris</i> | <i>Scenedesmus</i> sp. | <i>C. vulgaris</i>  |
| 1          | 0,62 $\pm$ 0,03        | 4,49 $\pm$ 0,42    | <0,06 (<LOD)           | 0,08-0,69           |
| 2          | 0,99 $\pm$ 0,48        | 11,18 $\pm$ 1,89   |                        | (LOD-LOQ)           |
| 3          | 0,06-0,52 (LOD-LOQ)    | 11,09 $\pm$ 1,46   | 0,06-0,52 (LOD-LOQ)    | 0,83 $\pm$ 0,02     |
| 4          |                        | 6,72 $\pm$ 1,56    |                        | 0,72 $\pm$ 0,01     |
| 7          | <0,06 (<LOD)           | 5,95 $\pm$ 0,51    |                        | 0,08-0,69 (LOD-LOQ) |

Como se puede observar en la Figura 4 - 46 (a) y (b), la degradación abiótica y la biodegradación son las principales vías de eliminación de E. Al comparar *Scenedesmus* sp. (Figura 4 - 46 (a)) y *C. vulgaris* (Figura 4 - 46 (b)), se puede comprobar

que, en el caso de la primera especie, la biodegradación de E ocurre principalmente durante los primeros días, mientras que con *C. vulgaris*, se produce al final del experimento. Como se mencionó previamente, *C. vulgaris* potencialmente libera AEOM al final de la fase exponencial, lo que favorece la degradación de E. En términos cuantitativos, con *Scenedesmus* sp. la degradación abiótica aumentó del 26,99% (día 1) al 39,82% (día 7), mientras que la biodegradación pasó de 0,00% a 27,17% (Figura 4 - 46 (a)), En el caso de *C. vulgaris*, la degradación abiótica se incrementó del 15,43% al 42,75% a lo largo de 7 días y la biodegradación del 0,00% al 40,27% (Figura 4 - 46 (b)) entre el cuarto y el séptimo día.

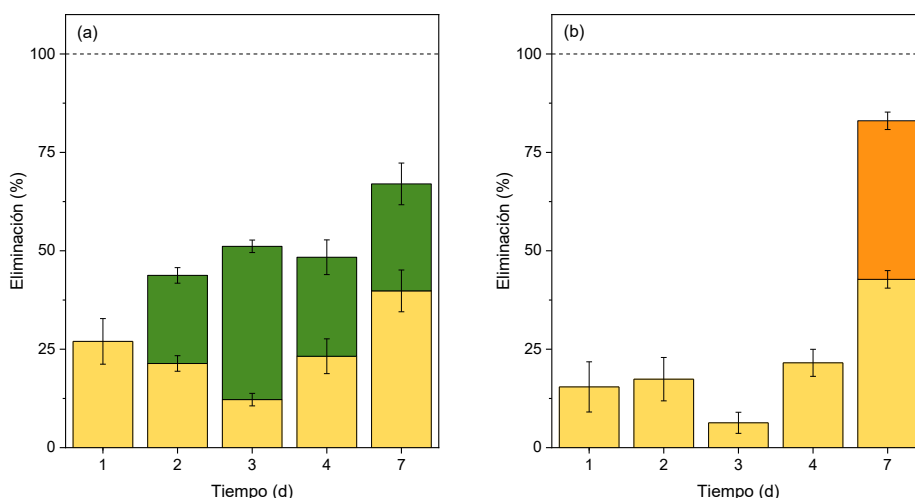


Figura 4 - 46. Contribución (%) de la degradación abiótica (amarillo), bioadsorción (rojo), bioacumulación (azul) y biodegradación (*Scenedesmus* sp. verde y *C. vulgaris* naranja) en la eliminación de E con *Scenedesmus* sp. (a) y con *C. vulgaris* (b). Las barras de error representan la  $\pm$  desviación estándar de la media ( $n=3$ ).

Comparar estos resultados con estudios previos es difícil, ya que E es uno de los estrógenos menos estudiados en este contexto, y los estudios disponibles son limitados. Además, en muchos de los estudios existentes, este compuesto se estudia como producto de degradación del 17 $\beta$ -estradiol. En este sentido, Ruksrithong et al. (2019) encontraron que la bioadsorción representaba el 10,0% de la eliminación total de E empleando *S. obliquus* y *C. vulgaris*, e identificaron la biodegradación como el principal mecanismo de eliminación para ambas especies. La biodegradación de E con *S. obliquus* fue del 77,0%, mientras que con *C. vulgaris* obtuvieron un 38,0% en 5 días [261]. Así, pues, aunque de forma general los resultados obtenidos en la presente tesis están de acuerdo con los recogidos en otros trabajos, debe tenerse en cuenta que dicha comparación puede no ser precisa, ya que las condiciones experimentales son muy diferentes en cada caso.

### 4.3. Valorización de la biomasa algal: digestión anaerobia

Para evaluar la posibilidad de valorizar energéticamente la biomasa algal tras el tratamiento de aguas residuales, se realizaron ensayos de digestión anaerobia para producir biogás. Para ello, se partió de biomasa recogida durante la fase estacionaria de *Scenedesmus* sp. y *C. vulgaris*, a la cual se aplicó un pretratamiento hidrotérmico de hidrólisis térmica (HT). Este pretratamiento tuvo como finalidad mejorar la biodegradabilidad de la biomasa y facilitar el acceso de las bacterias metanogénicas a las proteínas, lípidos y carbohidratos, y de este modo incrementar la producción de biogás. La digestión anaerobia se llevó a cabo en condiciones mesofílicas (37°C) durante 32 días, comparando los resultados obtenidos con la biomasa sin pretratar y pretratada, para evaluar la posible mejora aportada por dicho pretratamiento.

#### 4.3.1. Caracterización de la biomasa de partida

En la Tabla 4 - 27 se detalla la composición bioquímica de la biomasa de partida empleada para la producción de biogás, a la que posteriormente se someterá a un proceso de HT. Al comparar estas composiciones obtenidas durante la fase estacionaria con las obtenidas a los 7 días mostradas anteriormente (Tabla 4 - 16), se observó un aumento significativo de las proteínas y una disminución significativa de los lípidos para *Scenedesmus* sp. ( $p<0,05$ ). En el caso de *C. vulgaris*, se encontró también un aumento significativo de la cantidad de proteínas y una disminución significativa de los carbohidratos ( $p<0,05$ ).

Tabla 4 - 27. Contenido en carbohidratos, lípidos, proteínas y cenizas de la biomasa inicial de partida para la producción de biogás. Los errores representan la  $\pm$  desviación estándar de la media ( $n=3$ ).

|                              | <i>Scenedesmus</i> sp. | <i>C. vulgaris</i> |
|------------------------------|------------------------|--------------------|
| <b>Carbohidratos (% p/p)</b> | 19,92 $\pm$ 1,51       | 13,59 $\pm$ 2,46   |
| <b>Lípidos (% p/p)</b>       | 9,35 $\pm$ 0,63        | 12,62 $\pm$ 1,94   |
| <b>Proteínas (% p/p)</b>     | 65,48 $\pm$ 1,21       | 69,09 $\pm$ 1,46   |
| <b>Cenizas (% p/p)</b>       | 5,24 $\pm$ 0,39        | 4,70 $\pm$ 0,04    |

En cuanto a la composición elemental, al compararla con la obtenida a los 7 días (Tabla 4 - 28 y Tabla 4 - 17, respectivamente), se observa que en *Scenedesmus* sp. solo hubo un aumento significativo la cantidad de S ( $p<0,05$ ). Sin embargo, en *C. vulgaris*, se experimentó un incremento significativo en la cantidad de N y O, y una disminución significativa en la cantidad de H ( $p<0,05$ ).

Tabla 4 - 28. Composición elemental de la biomasa inicial de partida para la producción de biogás. Los errores representan la  $\pm$  desviación estándar de la media ( $n=3$ ).

|           | <b>Scenedesmus sp.</b> | <b>C. vulgaris</b> |
|-----------|------------------------|--------------------|
| <b>%N</b> | 7,58 $\pm$ 0,29        | 7,01 $\pm$ 0,06    |
| <b>%C</b> | 43,11 $\pm$ 2,20       | 48,93 $\pm$ 0,46   |
| <b>%H</b> | 6,88 $\pm$ 0,21        | 6,93 $\pm$ 0,11    |
| <b>%S</b> | 0,28 $\pm$ 0,03        | 0,12 $\pm$ 0,01    |
| <b>%O</b> | 37,14 $\pm$ 2,67       | 32,09 $\pm$ 0,43   |

### 4.3.2. Pretratamiento: hidrólisis térmica

Como se ha mencionado anteriormente, se aplicó un pretratamiento hidrotérmico a la biomasa de ambas especies con el objetivo de romper la pared celular, y así mejorar la biodegradabilidad de la misma durante la digestión anaerobia. Para evaluar la efectividad de la ruptura de la pared celular, se midieron las concentraciones de DQO, amonio y fosfatos solubles en las muestras de sobrenadante obtenidas antes y después del proceso de HT, cuyos resultados se presentan en la Tabla 4 - 29.

Tabla 4 - 29. Concentraciones de DQO, amonio y fosfatos para las muestras de sobrenadante previo y posterior al pretratamiento de HT. Los errores representan la  $\pm$  desviación estándar de la media ( $n=3$ ).

|                 | <b>Scenedesmus sp</b> |                       | <b>C. vulgaris</b>    |                       |
|-----------------|-----------------------|-----------------------|-----------------------|-----------------------|
|                 | C <sub>0</sub> (mg/L) | C <sub>F</sub> (mg/L) | C <sub>0</sub> (mg/L) | C <sub>F</sub> (mg/L) |
| <b>DQO</b>      | 1587,3 $\pm$ 1,6      | 5031,8 $\pm$ 24,7     | 2709,8 $\pm$ 40,9     | 6002,5 $\pm$ 72,2     |
| <b>Amonio</b>   | 23,0 $\pm$ 1,7        | 43,0 $\pm$ 0,5        | 68,1 $\pm$ 0,5        | 75,1 $\pm$ 3,4        |
| <b>Fosfatos</b> | 207,7 $\pm$ 12,9      | 469,5 $\pm$ 7,5       | 98,9 $\pm$ 2,5        | 425,4 $\pm$ 8,6       |

Como se puede observar, la DQO soluble experimentó un incremento de aproximadamente 3,2 veces en *Scenedesmus* sp y de 2,2 veces en *C. vulgaris* tras la hidrólisis térmica. Asimismo, el contenido en amonio soluble aumentó aproximadamente 1,9 veces en *Scenedesmus* sp. y 1,1 veces en *C. vulgaris*. Por último, los fosfatos solubles se incrementaron 2,3 veces en *Scenedesmus* sp. y 4,3 veces en *C. vulgaris*, respectivamente. Estos aumentos se atribuyen a la ruptura de la pared celular, que permite liberar compuestos intracelulares al medio, incrementando la DQO soluble. Entre estos compuestos se encuentran proteínas y otros compuestos de nitrógeno, que contribuyen al aumento de los niveles de amonio soluble, así como de fosfatos intracelulares. Los resultados de la prueba t para muestras emparejadas revelaron además que los incrementos de estos tres parámetros eran significativos ( $p>0,05$ ).

Para apreciar de forma más clara estas diferencias entre las concentraciones iniciales y finales, empleando las dos especies de microalgas estudiadas, en la Figura 4 - 47 se representan las concentraciones normalizadas, expresadas como C/C<sub>0</sub>.

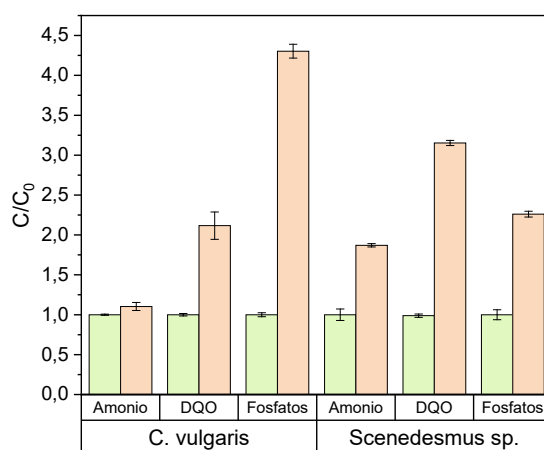


Figura 4 - 47. Resultados normalizados de DQO, amonio y fosfatos para las muestras de sobrenadante anterior (verde) y posterior (naranja) al pretratamiento de hidrólisis térmica. Las barras de error representan la  $\pm$  desviación estándar de la media ( $n=3$ ).

En la Figura 4 - 47 se puede observar que, para *C. vulgaris*, el proceso de HT liberó principalmente fosfatos al medio, aumentando su concentración en un 330% respecto a la muestra inicial. Asimismo, la DQO aumentó un 121,5% su concentración y, finalmente, la concentración de amonio soluble también aumentó, pero en mucha menor medida (10,3%). Por el contrario, en el proceso de HT con *Scenedesmus sp.*, el incremento de estos parámetros siguió una tendencia diferente, siendo la DQO la que experimentó un mayor aumento (217%), seguida de la concentración de fosfatos (126%), y por último la concentración de amonio (87%).

El aumento observado en la DQO soluble, el amonio y los fosfatos solubles tras el pretratamiento de HT está de acuerdo con los resultados recogidos en la literatura. En este sentido, Alzate et al. (2012) registraron un incremento de 3,1 veces en la concentración de amonio tras someter a la biomasa de una mezcla de microalgas compuesta por un 40% por *Chlamydomonas*, 20% por *Scenedesmus* y 40% por *Nannocloropsis* a un proceso de HT durante 15 minutos a 140 °C y 1,2 bar de presión. Además, la DQO soluble, expresada como grado de solubilización, aumentó un 16% respecto al control [418]. Por otro lado, Keymer et al. (2013) encontraron que, al someter a biomasa de una mezcla de microalgas enriquecida principalmente en *Scenedesmus* a un proceso de HT de alta presión durante 30 minutos a 170 °C y 800 kPa, la fracción de DQO soluble respecto a la DQO total se incrementaba aproximadamente 10 veces en comparación con la biomasa sin tratar [419]. Finalmente, González-Fernández et al. (2012) obtuvieron un aumento de la DQO de 2,3 veces, de 4,8 veces para el amonio soluble y de 33 veces para los fosfatos solubles aplicando un tratamiento térmico a 80°C a *Scenedesmus sp* [420].

Los resultados obtenidos indican que, con el pretratamiento llevado a cabo sobre las microalgas estudiadas, se consiguió la liberación de compuestos intracelulares, mejorando la disponibilidad de sustratos solubles para las bacterias durante la digestión anaerobia de las microalgas.

### 4.3.3. Producción de biogás

#### 4.3.3.1. Curvas BMP

Los resultados de producción de metano (BMP) obtenido para la biomasa de *Scenedesmus* sp. y *C. vulgaris*, sin y con pretratamiento, se presentan en la Figura 4 - 48. Como se puede observar, tanto para *Scenedesmus* sp. como para *C. vulgaris*, se obtuvieron mayores valores de BMP con la biomasa sometida a HT en comparación con la biomasa sin pretratar. Este resultado era esperable, ya que, como se había comentado previamente, tras un pretratamiento, la pared celular que dificulta la hidrólisis enzimática de la biomasa se encuentra deteriorada, mejorando la digestibilidad de la microalga [421].

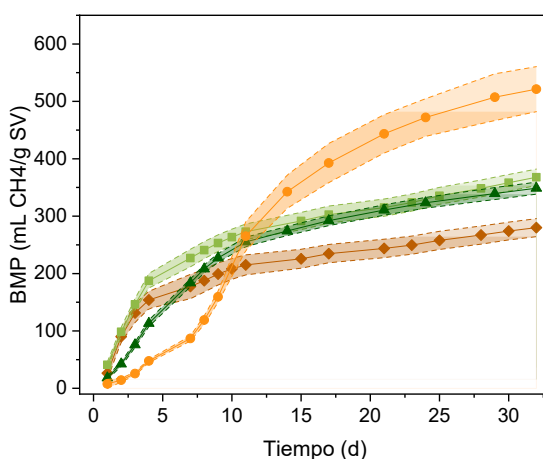


Figura 4 - 48. Producción de metano acumulado a partir de *Scenedesmus* sp. pretratada (cuadrado verde) y sin pretratar (rombo marrón) y *C. vulgaris* pretratada (circulo naranja) y sin pretratar (triangulo verde). Se representan la media de las réplicas ( $n=3$ ) y los intervalos de confianza (95%) para cada caso.

Respecto a *Scenedesmus* sp., se obtuvo un máximo de BMP a los 32 días de 280,01 mL CH<sub>4</sub>/g SV para la biomasa sin pretratar y de 367,72 mL CH<sub>4</sub>/g SV para la biomasa pretratada, lo que representa un incremento de aproximadamente 1,3 veces. Además, los intervalos de confianza de ambos experimentos no se solapaban, por lo que este incremento fue significativo. Por otro lado, con *C. vulgaris*, el máximo a los 32 días fue de 348,82 mL CH<sub>4</sub>/g SV para la biomasa sin pretratar y de 521,35 mL CH<sub>4</sub>/g SV para la biomasa pretratada, lo que supone un aumento de aproximadamente 1,5 veces. Al igual que con *Scenedesmus* sp., los intervalos de

confianza no se solapaban entre las muestras, por lo que el aumento en la cantidad de biogás obtenido fue significativo.

Analizando la Figura 4 - 48 se observó un desfase en la producción de biogás entre *C. vulgaris* y *Scenedesmus* sp. Tanto para la biomasa sin pretratar (7 días) como para la biomasa pretratada (11 días) *Scenedesmus* sp. produjo más metano. Sin embargo, a partir de ese tiempo, la tendencia se revirtió. Para explicar este resultado se debe prestar atención al contenido de carbohidratos, proteínas y lípidos, ya que el tiempo de degradación de estos tres compuestos varía, siendo el menor para los carbohidratos, seguido de las proteínas y, finalmente, de los lípidos [422]. Por ello, es lógico que la especie con una cantidad significativamente mayor de carbohidratos ( $p>0,05$ ) comenzara a generar más biogás a tiempo inicial. Por otro lado, el desfase observado en la producción de metano fue notablemente más marcado en el caso de las biomásas pretratadas, lo que puede atribuirse a la formación de compuestos recalcitrantes durante el pretratamiento térmico que inhiben la digestión anaerobia [418]. Finalmente, es destacable que el empleo del proceso de HT permitió equiparar la producción de biogás de *Scenedesmus* sp. a la de *C. vulgaris* sin pretratar, convirtiéndolo en un sustrato más adecuado para la digestión anaerobia.

A partir de la composición elemental fue posible estimar el rendimiento máximo teórico de metano (TMP) que se puede obtener con ambas especies de acuerdo con la ecuación ( 25 ). En la Tabla 4 - 30 se presenta la composición obtenida para cada especie y los resultados de TMP.

Tabla 4 - 30. Valores de TMP obtenidos a partir de la composición elemental de la biomasa.

|                               | Composición                                            | TMP<br>(mL CH <sub>4</sub> /g SV) |
|-------------------------------|--------------------------------------------------------|-----------------------------------|
| <b><i>Scenedesmus</i> sp.</b> | CH <sub>1,92</sub> O <sub>0,65</sub> N <sub>0,15</sub> | 441,94                            |
| <b><i>C. vulgaris</i></b>     | CH <sub>1,70</sub> O <sub>0,49</sub> N <sub>0,12</sub> | 525,75                            |

De acuerdo con los resultados obtenidos, se estima que la producción de metano debería ser 1,2 veces superior al emplear *C. vulgaris* como sustrato en comparación con *Scenedesmus* sp.. Esta diferencia se debe a que una mayor cantidad de lípidos en la célula conlleva un mayor potencial de metano, ya que los lípidos presentan un mayor contenido energético, lo que los hace más atractivos como sustrato para la digestión anaerobia en comparación con los carbohidratos o las proteínas; como lo demuestra su rendimiento específico de metano para dichos compuestos: 851 mL CH<sub>4</sub>/g SV para las proteínas, 1014 mL CH<sub>4</sub>/g SV para los lípidos y 415 mL CH<sub>4</sub>/g SV para los carbohidratos [422]. Tal como se muestra en la Tabla 4 - 27, el contenido en lípidos en *C. vulgaris* fue significativamente mayor ( $p>0,05$ ) que en *Scenedesmus* sp., lo que lo convierte en un sustrato más adecuado para la obtención de biogás. Esta tendencia se confirmó al comparar los resultados experimentales de producción final de metano (Figura 4 - 48) con el TMP, observándose una mayor producción con *C.*

*vulgaris* en todos los casos, particularmente 1,2 veces más metano que *Scenedesmus* sp. sin pretratamiento y 1,4 veces más tras aplicar el pretratamiento.

En la Tabla 4 - 31 se presenta una comparativa entre los resultados obtenidos en este estudio y los reportados en la bibliografía. Para *Scenedesmus* sp. sin pretratamiento, el valor de BMP alcanzado a los 32 días fue muy similar al descrito en estudios previos. Por ejemplo, Frigon et al. (2013) obtuvieron valores de 306,0 y 258,0 mL CH<sub>4</sub>/g SV en 34 días utilizando las cepas AMDD Nov-2010 y PN2, respectivamente [276]. De forma similar, Feroso et al. (2016) reportaron una producción de 332,0 mL CH<sub>4</sub>/g SV con *S. obliquus* [419]. Al comparar el valor de BMP obtenido en el presente estudio con la biomasa de *Scenedesmus* sp. pretratada, también se observaron valores similares a los reportados previamente para experimentos con duración parecida [306,419].

Tabla 4 - 31. Comparativa de la BMP experimental final obtenida con estudios previos.

| Especie                | Pretratamiento | Tiempo (días) | BMP (mL CH <sub>4</sub> /g SV) | Referencia   |
|------------------------|----------------|---------------|--------------------------------|--------------|
| <i>Scenedesmus</i> sp. | Sin tratar     | 32            | 280,01                         | Este estudio |
|                        |                | 34            | 306,00                         | [276]        |
|                        |                | 34            | 258,00                         |              |
| <i>S. obliquus</i>     |                | 27            | 332,00                         | [423]        |
| <i>Scenedesmus</i> sp. | HT             | 32            | 367,72                         | Este estudio |
|                        |                | 35            | ~320,00                        | [419]        |
| <i>S. obliquus</i>     |                | 35            | 313,00-548,00                  | [306]        |
| <i>C. vulgaris</i>     | Sin tratar     | 32            | 348,82                         | Este estudio |
|                        |                | 30            | 369,00                         | [284]        |
|                        |                | 140           | 361,00                         | [337]        |
|                        |                | 49            | 286,00                         | [424]        |
|                        |                | 34            | 361,00                         | [276]        |
| <i>C. vulgaris</i>     | HT             | 32            | 521,35                         | Este estudio |
| <i>C. pyrenoidosa</i>  |                | 10            | 348,00                         | [425]        |
| <i>C. sorokiniana</i>  |                | 35            | 298,00-461,00                  | [306]        |

Por otro lado, con *C. vulgaris* sin pretratar se obtuvo una producción de biogás comparable a la reportada en la bibliografía. Por ejemplo, Prajapati et al. (2014) alcanzaron 369,0 mL CH<sub>4</sub>/g SV con esta especie en 30 días [284]. De manera similar, Sakarika et al. (2019) obtuvieron 361,0 mL CH<sub>4</sub>/g SV en 140 días [337], mientras que Frigon et al. (2013) lograron ese mismo valor en solo 34 días [276]. Por su parte, Lakaniemi et al. (2011) reportaron valores ligeramente inferiores, con 286,0 mL CH<sub>4</sub>/g SV en 49 días [424]. En cuanto a la biomasa pretratada, la cantidad de biogás obtenida fue superior a la reportado en otros trabajos. Por ejemplo, Xiao et al. (2019) obtuvieron

348,0 mL CH<sub>4</sub>/g SV tras aplicar un pretratamiento de HT a *C. pyrenoidosa* [425]. Asimismo, Ometto et al. (2014) alcanzaron entre 298,0 y 461,0 mL CH<sub>4</sub>/g SV en 35 días utilizando *C. sorokiniana* [306].

Con los datos de producción de metano final obtenido para cada una de las especies se pudo estimar la biodegradabilidad que había sufrido la biomasa en cada caso, de acuerdo con la ecuación ( 26 ) y cuyos resultados se presentan en la Tabla 4 - 32.

Tabla 4 - 32. Valores de producción de metano (BMP) final para *Scenedesmus* sp. y *C. vulgaris* con y sin pretratamiento y % de biodegradabilidad.

|                                                          | <b><i>Scenedesmus</i> sp</b> |        | <b><i>C. vulgaris</i></b> |        |
|----------------------------------------------------------|------------------------------|--------|---------------------------|--------|
|                                                          | Sin pretratar                | Con HT | Sin pretratar             | Con HT |
| <b>Producción de metano<br/>(mL CH<sub>4</sub>/g SV)</b> | 280,01                       | 367,72 | 348,82                    | 521,35 |
| <b>Biodegradabilidad (%)</b>                             | 63,36                        | 83,21  | 66,35                     | 99,16  |

Para ambas especies se observó una mayor biodegradabilidad en la biomasa pretratada en comparación con la que no fue sometida a pretratamiento. En concreto, la biodegradabilidad aumentó 1,3 veces en *Scenedesmus* sp. y 1,5 veces en *C. vulgaris* al comparar las muestras sin pretratar con las pretratadas.

La comparación de los resultados de biodegradabilidad obtenidos con *Scenedesmus* sp. y *C. vulgaris* con los reportados en bibliografía resulta complejo, ya que la producción de metano está fuertemente influenciada por numerosos parámetros operativos. Así, Saleem et al. (2024) obtuvieron una biodegradabilidad del 88,8% con *Scenedesmus* sp. sin pretratar y lograron incrementarla hasta el 96,8% tras aplicar un pretratamiento hidrotermal de 30 minutos a 120°C y hasta 98,7% a 150°C [426]. En el caso de *C. vulgaris*, Sakarika et al. (2019) alcanzaron una biodegradabilidad del 91,38% en condiciones mesofílicas tras 140 días de experimento [337]. Sin embargo, otros estudios como el de Mendez et al. (2015) reportaron un valor mucho más bajo, del 35,9%, trabajando también con *C. vulgaris* [427]. Por tanto, aunque sea de forma cualitativa, se puede afirmar que los resultados obtenidos son acordes a los presentados en trabajos previos con microalgas similares.

Una vez analizados los resultados de producción de biogás se procedió al cálculo de los parámetros cinéticos de la misma con las diferentes microalgas estudiadas. Para ello, se ajustaron los datos experimentales a un modelo cinético de primer orden, de acuerdo con la ecuación ( 28 ). Este modelo permite determinar dos parámetros clave: la constante cinética de hidrólisis ( $k_H$ ), suponiendo que la etapa de hidrólisis es la etapa limitante del proceso [273], y el potencial máximo metanogénico teórico (P). Los ajustes obtenidos se representan en la Figura 4 - 49.

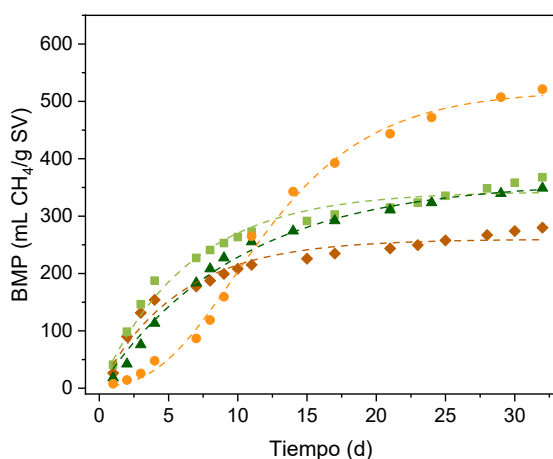


Figura 4 - 49. Modelo de primer orden para *Scenedesmus* sp. sin pretratar (línea discontinua marrón) y pretratada (línea discontinua verde claro) y *C. vulgaris* sin pretratar (línea discontinua verde oscuro) y modelo de Gompertz modificado para *C. vulgaris* pretratada (línea discontinua naranja).

Sin embargo, en el caso de *C. vulgaris* pretratada, la curva de producción de metano no se ajustó a un modelo cinético de primer orden, debido a la presencia de una fase de retraso inicial. Por este motivo, se optó por aplicar el modelo Gompertz modificado (ecuación ( 29 )). A partir de este modelo se obtienen los parámetros característicos: el potencial máximo metanogénico teórico (P), la tasa máxima de producción de metano ( $R_m$ ) y la duración de la fase de retraso ( $\lambda$ ).

En la Tabla 4 - 33 se recogen los valores de los parámetros cinéticos obtenidos con ambos modelos. Se observa que el valor de P fue ligeramente inferior al valor experimental para *Scenedesmus* sp., tanto en la biomasa pretratada (7,2% menor) como sin pretratar (6,6% menor).

Tabla 4 - 33. Parámetros cinéticos de la producción de biogás a partir de *Scenedesmus* sp. y *C. vulgaris* con y sin pretratamiento.

| Parámetros                         | <i>Scenedesmus</i><br>sp. sin HT | <i>Scenedesmus</i><br>sp. con HT | <i>C.</i><br><i>vulgaris</i><br>sin HT | <i>C.</i><br><i>vulgaris</i><br>con HT |
|------------------------------------|----------------------------------|----------------------------------|----------------------------------------|----------------------------------------|
| $k_H$ (d <sup>-1</sup> )           | 0,18                             | 0,16                             | 0,10                                   | -                                      |
| P (mL CH <sub>4</sub> /g SV)       | 259,84                           | 343,45                           | 361,11                                 | 518,98                                 |
| $R_m$ (mL CH <sub>4</sub> /g SV·d) | -                                | -                                | -                                      | 94,17                                  |
| $\lambda$                          | -                                | -                                | -                                      | 4,13                                   |
| R <sup>2</sup>                     | 0,959                            | 0,975                            | 0,990                                  | 0,995                                  |

Para *C. vulgaris* sin pretratamiento, el valor de P fue levemente superior al experimental, con una diferencia del 3,4%, mientras que, para la biomasa pretratada, el valor estimado de P coincidió prácticamente con el valor experimental

#### 4.3.3.2. Caracterización de la fase acuosa de la digestión anaerobia

La fase acuosa previa y posterior a la digestión anaerobia en los experimentos control y en los experimentos con microalgas con y sin pretratamiento fue caracterizada con el objetivo de identificar los procesos que tuvieron lugar durante las distintas etapas del proceso de producción de metano. Para ello, se cuantificaron las concentraciones de amonio, fosfato, DQO y NT solubles (Tabla 4 - 34).

Como se observa en la Tabla 4 - 34, el inóculo de partida de los experimentos con *Scenedesmus* sp. y con *C. vulgaris* fue diferente en cuanto al contenido de fosfatos y DQO, siendo bastante menor en el caso del inóculo de esta última especie. En todos los casos, el valor de los parámetros analizados aumenta entre el control y la biomasa sin pretratar, y aún más para la biomasa pretratada con HT. Esto se debe a que para llevar a cabo la digestión anaerobia de la biomasa sin pretratar se adiciona el sobrenadante procedente directamente del cultivo, mientras que en los experimentos con biomasa pretratada se adiciona el sobrenadante procedente del pretratamiento. Este último es más rico en DQO, fosfatos y amonio que el sobrenadante del cultivo (Tabla 4 - 34 Tabla 4 - 29), lo que favorece la actividad microbiana, resultando en una mayor producción de metano, como se ha mostrado anteriormente (Figura 4 - 48).

El amonio desempeña un papel crucial como regulador del pH y fuente de nitrógeno, promoviendo el crecimiento microbiano y mejorando la estabilidad del proceso de digestión anaerobia [428]. Sin embargo, en concentraciones en el rango de 1500 a 7000 mg/L, el amonio inhibe la producción de biogás, afectando principalmente a la fase de metanogénesis [429]. Como se puede observar en la Tabla 4 - 34, la concentración inicial de amonio está lejos de inhibir el proceso de producción de metano. Por otro lado, a medida que los productos orgánicos nitrogenados presentes en el medio se degradan durante la digestión anaerobia, se produce una elevada concentración de amonio [430]. Por este motivo, se observó un aumento entre la concentración de amonio medida al inicio y tras la digestión anaerobia (Tabla 4 - 34). Así, el inóculo empleado con *Scenedesmus* sp. incrementó su concentración de amonio 1,1 veces, mientras que para los experimentos con biomasa sin pretratar y tratada dicho incremento fue de 1,4 y 1,7 veces, respectivamente. Asimismo, con *C. vulgaris*, el inóculo aumentó 1,1 veces también su concentración de amonio, y las muestras con biomasa sin pretratar y pretratada lo hicieron 1,7 y 1,8 veces, respectivamente. Pese a este aumento, la concentración final de amonio no alcanzó niveles que pudieran inhibir la producción de biogás.

Tabla 4 - 34. Contenido en amonio, fosfatos, DQO y nitrógeno total de las muestras iniciales de la digestión anaerobia. Los errores representan la  $\pm$  desviación estándar de la media ( $n=3$ ).

| Muestras iniciales                       | Amonio<br>(mg/L) | Fosfatos<br>(mg/L) | DQO<br>(mg/L)     | N Total<br>(mg/L) |
|------------------------------------------|------------------|--------------------|-------------------|-------------------|
| <b>Control</b>                           |                  |                    |                   |                   |
| <b><i>Scenedesmus</i> sp.</b>            | 297,6 $\pm$ 5,6  | 123,4 $\pm$ 11,0   | 1298,5 $\pm$ 42,4 | 256,3 $\pm$ 16,9  |
| <b><i>Scenedesmus</i> sp.<br/>sin HT</b> | 322,8 $\pm$ 36,8 | 145,5 $\pm$ 7,3    | 2055,2 $\pm$ 17,9 | 295,1 $\pm$ 37,1  |
| <b><i>Scenedesmus</i> sp.<br/>con HT</b> | 339,3 $\pm$ 17,7 | 187,2 $\pm$ 12,3   | 2218,9 $\pm$ 9,0  | 358,6 $\pm$ 11,1  |
| <b>Control <i>C. vulgaris</i></b>        | 269,3 $\pm$ 15,1 | 2,7 $\pm$ 0,9      | 175,9 $\pm$ 2,5   | 333,5 $\pm$ 35,5  |
| <b><i>C. vulgaris</i> sin HT</b>         | 316,1 $\pm$ 33,6 | 47,9 $\pm$ 0,7     | 1610,0 $\pm$ 72,6 | 430,3 $\pm$ 18,2  |
| <b><i>C. vulgaris</i> con HT</b>         | 334,2 $\pm$ 32,7 | 52,9 $\pm$ 2,1     | 2214,9 $\pm$ 76,0 | 494,9 $\pm$ 19,7  |
| <b>Muestras finales</b>                  |                  |                    |                   |                   |
| <b>Control</b>                           |                  |                    |                   |                   |
| <b><i>Scenedesmus</i> sp.</b>            | 323,5 $\pm$ 19,9 | 120,8 $\pm$ 7,2    | 239,3 $\pm$ 17,0  | 405,2 $\pm$ 21,4  |
| <b><i>Scenedesmus</i> sp.<br/>sin HT</b> | 450,6 $\pm$ 9,6  | 223,4 $\pm$ 24,3   | 383,7 $\pm$ 13,7  | 667,3 $\pm$ 32,1  |
| <b><i>Scenedesmus</i> sp.<br/>con HT</b> | 587,1 $\pm$ 10,5 | 259,5 $\pm$ 15,7   | 384,2 $\pm$ 34,1  | 704,6 $\pm$ 44,4  |
| <b>Control <i>C. vulgaris</i></b>        | 289,8 $\pm$ 12,4 | 5,8 $\pm$ 0,2      | 181,5 $\pm$ 29,1  | 390,3 $\pm$ 23,0  |
| <b><i>C. vulgaris</i> sin HT</b>         | 532,3 $\pm$ 11,6 | 40,4 $\pm$ 0,3     | 251,8 $\pm$ 24,9  | 683,1 $\pm$ 4,6   |
| <b><i>C. vulgaris</i> con HT</b>         | 618,2 $\pm$ 19,1 | 51,0 $\pm$ 0,6     | 709,2 $\pm$ 130,1 | 741,1 $\pm$ 52,3  |

En cuanto a los fosfatos, son necesarios tanto para el mantenimiento de un pH óptimo como para el crecimiento microbiano, ya que son componentes principales de las moléculas portadoras de energía en las poblaciones bacterianas (ATP y NADP) [431]. Por este motivo, lo lógico habría sido observar una disminución de la concentración de fosfatos durante la digestión anaerobia. Sin embargo, esta tendencia solo se observó en *C. vulgaris* sin pretratar y pretratada, con disminuciones del 15,7% y 3,6%, respectivamente. Aunque hay un ligero descenso de la concentración de fosfatos también en el inóculo de *Scenedesmus* sp. las diferencias no fueron significativas ( $p>0,05$ ). Sin embargo, este aumento de fosfatos tras la digestión anaerobia ya fue hallado previamente por Keymer et al. (2013) [419], quienes sugirieron que probablemente podría estar propiciado por el propio proceso de solubilización de los fosfatos, el cual depende del pH. Estudios previos indican que la solubilidad de los fosfatos disminuye cuando el pH se encuentra por encima de 8,5 [432]. En la Tabla 4 - 35 se muestran los valores de pH iniciales y finales de los experimentos de control, así como de los experimentos con microalga sin pretratar y pretratada. De acuerdo con estos valores de pH, la disminución de la solubilidad de los fosfatos podría estar ocurriendo con *Scenedesmus* sp., ya que los pH iniciales y finales se encuentran muy cercanos a 8,5.

Tabla 4 - 35. Valores de pH para las muestras al inicio y al final de la digestión anaerobia. Los errores representan la  $\pm$  desviación estándar de la media ( $n=3$ ).

|                   | <b>Scenedesmus sp.</b> |                 |                 | <b>C. vulgaris</b> |                 |                 |
|-------------------|------------------------|-----------------|-----------------|--------------------|-----------------|-----------------|
|                   | Control                | Sin HT          | Con HT          | Control            | Sin HT          | Con HT          |
| <b>pH inicial</b> | 8,30 $\pm$ 0,03        | 8,34 $\pm$ 0,11 | 8,28 $\pm$ 0,01 | 7,45 $\pm$ 0,11    | 7,31 $\pm$ 0,03 | 7,39 $\pm$ 0,02 |
| <b>pH final</b>   | 8,33 $\pm$ 0,03        | 8,29 $\pm$ 0,03 | 8,24 $\pm$ 0,04 | 8,08 $\pm$ 0,11    | 7,95 $\pm$ 0,05 | 7,77 $\pm$ 0,02 |

La concentración más elevada de NT tanto al inicio como al final del proceso de digestión anaerobia se dio en las muestras que habían sido pretratadas (Tabla 4 - 34). Este hecho se basa en la mayor accesibilidad al nitrógeno que ofrece la biomasa cuando se encuentra rota. Además, las muestras con biomasa sin pretratar también presentaron una concentración de nitrógeno total más elevada respecto del inóculo, particularmente de 1,2 y 1,6 veces para *Scenedesmus* sp. inicial y final, respectivamente, y de 1,3 y 1,8 veces para *C. vulgaris* inicial y final, respectivamente.

La DQO es un parámetro indicativo de la cantidad de materia orgánica biodegradable presente, que a su vez actúa como fuente de energía para los microorganismos generadores de biogás. Por lo tanto, se espera que cuanto mayor sea la DQO al inicio del experimento, mayor será la cantidad de biogás obtenida. Como se observa en la Tabla 4 - 34, *Scenedesmus* sp. y *C. vulgaris* con pretratamiento presentaron las mayores concentraciones de DQO, siendo muy similares; sin embargo, *C. vulgaris* generó 1,4 veces más biogás que *Scenedesmus* sp. a los 32 días (Figura 4 - 48). Esto puede deberse a la relación DQO:N:P que presentaban. La relación óptima DQO:N:P suele estar en torno a 300:5:1 [433], aunque se han reportado muchas otras. La relación DQO:N:P obtenida experimentalmente fue de 11,9:1,9:1 para *Scenedesmus* sp. con pretratamiento y de 41,9:9,4:1 para *C. vulgaris* con pretratamiento. En ambos casos, estas relaciones se encontraban bastante lejos del óptimo; sin embargo, *C. vulgaris* presentó una mayor relación respecto a la DQO, lo que probablemente generó una mayor cantidad de biogás.

## 4.4. Evaluación de un sistema basado en microalgas como tratamiento terciario

Tras los prometedores resultados obtenidos con el empleo de un sistema basado en microalgas como tratamiento biológico, se evaluó también la posibilidad de su uso como tratamiento terciario. Para ello, se seleccionó la especie que mejor se adaptó a crecer en agua residual real (ARR) procedente de la salida del clarificador secundario y se llevaron a cabo experimentos de degradación de CDEs (añadidos a dicho ARR) durante 7 días a mayor escala.

### 4.4.1. Caracterización del agua residual

En primer lugar, se caracterizó el ARR en términos de contenido de nitrógeno total (NT), amonio, nitratos, fosfatos y pH, cuyos resultados se presentan en la Tabla 4 - 36. Se observó que el NT estaba compuesto principalmente por nitratos, representando el 56,9% del total. En contraste, el amonio y los nitritos constituían solo el 18,8% y el 6,3% del NT, respectivamente, sugiriendo que el 18% restante correspondía a nitrógeno orgánico.

Tabla 4 - 36. Caracterización del agua residual procedente de la decantación secundaria. Los errores representan la  $\pm$  desviación estándar de la media ( $n=3$ ).

| Parámetro                                      | Valor          |
|------------------------------------------------|----------------|
| Nitrógeno total (mg N/L)                       | 10,2 $\pm$ 0,3 |
| Amonio (mg NH <sub>4</sub> -N/L)               | 1,9 $\pm$ 0,5  |
| Nitratos (mg NO <sub>3</sub> -N/L)             | 5,8 $\pm$ 0,5  |
| Nitritos (mg NO <sub>2</sub> -N/L)             | 0,6 $\pm$ 0,1  |
| Fosfatos (mg PO <sub>4</sub> <sup>3-</sup> /L) | 1,1 $\pm$ 0,6  |
| DQO (mg DQO/L)                                 | 35,1 $\pm$ 3,9 |
| N:P                                            | 9,7:1          |
| pH                                             | 6,8 $\pm$ 0,3  |

La composición obtenida fue muy similar a la reportada en la bibliografía para efluentes de tratamiento secundario de diversas EDAR. Por ejemplo, Zhou et al. (2022) encontraron concentraciones de NT entre 4,2 y 10,1 mg N/L, concentraciones de amonio entre 0,03 y 2,85 mg N/L, concentraciones de fósforo total (PT) entre 0,04 y 0,55 mg P/L y concentraciones de DQO entre 9,0 y 47,0 mg/L al caracterizar once efluentes de tratamientos secundarios procedentes de diferentes EDAR de China [434]. Además, otros autores han encontrado concentraciones de NT entre 6,0 y 13,6 mg N/L, de amonio entre 2,0 y 12,7 mg N/L y de nitratos entre 0,0 y 5,4 mg N/L para efluentes secundarios de tres plantas diferentes de Massachusetts [435]. Por otro lado, el pH obtenido también se encontraba dentro del rango habitual, que suele estar entre 6,3 y 8,5 [436,437].

#### 4.4.2. Selección de la especie de microalga

Un paso crucial para la correcta eliminación de los CDEs fue determinar si las dos especies de microalgas estudiadas podían crecer en un ARR procedente de la salida de la decantación secundaria que, como se mostraba en la Tabla 4 - 36, contenía pocos nutrientes. En la Figura 4 - 50 se presentan los resultados de crecimiento para *C. vulgaris* y *Scenedesmus* sp. crecidas en 500 mL de volumen. Para el caso de *C. vulgaris*, solo se presentan resultados hasta el día 7 debido a que en ese tiempo esta especie estaba en fase de muerte y precipitada en el fondo del cultivo, tal y como se muestra en la Figura 4 - 51, por lo que se tuvo que detener antes de tiempo, alcanzando una concentración máxima de biomasa de 0,25 g/L a los 6 días. De esta forma, quedó demostrado que *C. vulgaris* no es apta para su crecimiento en el ARR empleada. Sin embargo, *Scenedesmus* sp. mostró una mejor adaptación, alcanzando una concentración de biomasa de 0,74 g/L a 15 días y, en general, un crecimiento claramente superior a *C. vulgaris*. De acuerdo con los resultados obtenidos con una prueba t, el crecimiento de *Scenedesmus* sp. fue significativamente mayor que el de *C. vulgaris* con estas condiciones de cultivo ( $p < 0,05$ ), exceptuando el primer día.

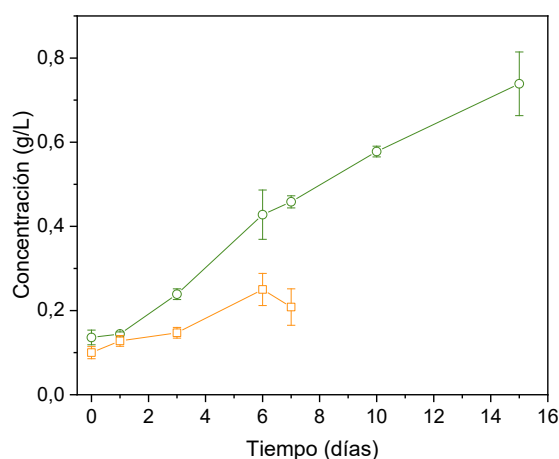


Figura 4 - 50. Curvas de crecimiento durante 15 días para *Scenedesmus* sp (círculo abierto verde) y durante 7 días para *C. vulgaris* (cuadrado abierto naranja) Las barras de error representan la  $\pm$  desviación estándar de la media ( $n=3$ ).

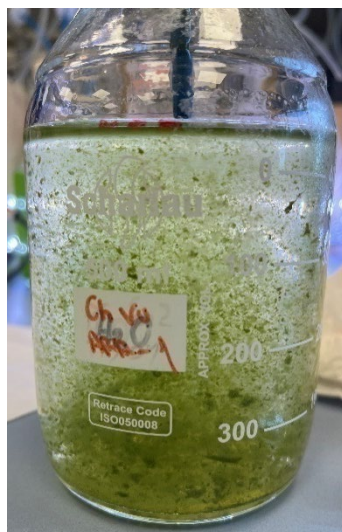


Figura 4 - 51. Cultivo de *C. vulgaris* tras 7 días en ARR.

El bajo crecimiento obtenido con *C. vulgaris* está relacionado con la forma en la que está presente el nitrógeno en el agua residual. Como se comentó previamente en la sección 4.2.1, esta especie tiene preferencia por el amonio como fuente de nitrógeno; sin embargo, en el agua residual el nitrógeno se encontraba principalmente en forma de nitratos, fuente de nitrógeno preferida por *Scenedesmus* sp., lo que hace que esta agua residual sea un medio mucho más adecuado para el crecimiento de esta especie en comparación con el ARS. En este sentido, Arbib et al. (2013) demostraron que la relación N:P óptima para alcanzar la máxima productividad de biomasa para *Scenedesmus obliquus* cultivada en discontinuo está entre 9 y 13 [438]. La relación N:P que se obtuvo para el agua residual objeto de estudio (Tabla 4 - 36) se encuentra entre dicho rango, lo es otro factor que probablemente favorece el mayor crecimiento de *Scenedesmus* sp. en este medio.

En cuanto a la eliminación de nutrientes durante ese periodo, la Figura 4 - 52 (a) muestra que *Scenedesmus* sp. eliminó todo el contenido de fosfatos del agua residual en 3 días y el de nitratos en 7 días. Sin embargo, aunque a partir de los 7 días la cantidad de nutrientes era muy baja, la cantidad de biomasa de *Scenedesmus* sp. continuó aumentando a un ritmo de producción aproximado de 0,035 g/L·d durante los últimos 8 días. Probablemente, una vez consumidos todos los nitratos, *Scenedesmus* sp. comenzó a utilizar otras fuentes de nitrógeno presentes en el agua residual, como el amonio, lo que ralentizó su crecimiento, ya la producción durante los primeros 7 días fue de 0,046 g/L·d (superior a los 0,035 g/L·d de los últimos 8 días). Respecto al fósforo, los efluentes secundarios suelen contener ortofosfatos, fósforo orgánico disuelto, fósforo unido a metales y fósforo orgánico particulado. La proporción típica respecto al PT suele ser 75,4% ortofosfatos, 16,4% fósforo orgánico disuelto, 4,1% fósforo enlazado a metales y 4,1% fósforo orgánico particulado, siendo

predominantemente fósforo disuelto [434]. De este modo, aunque *Scenedesmus* sp. agotara todos los ortofosfatos presentes en el agua residual, es posible que estuviera obteniendo P también de otras fuentes presentes en el medio.

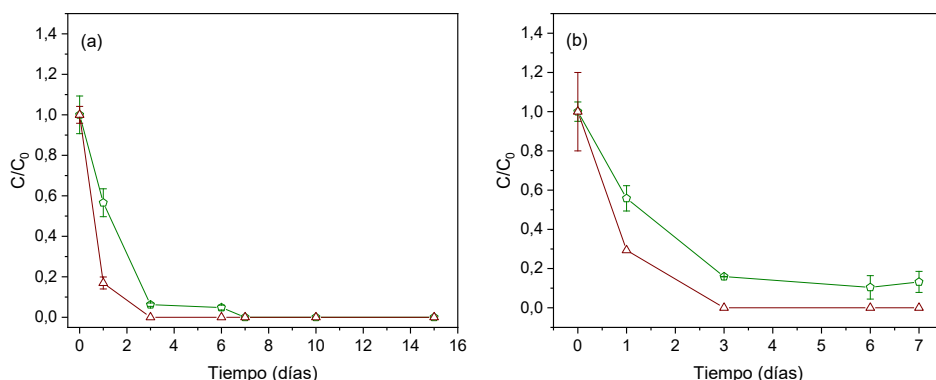


Figura 4 - 52. Eliminación de fosfatos (triángulo marrón abierto) y nitratos (hexágono verde abierto) por *Scenedesmus* sp. (a) y *C. vulgaris* (b). Las barras de error representan la  $\pm$  desviación estándar de la media ( $n=3$ ).

La Figura 4 - 52 (b) muestra que *C. vulgaris* eliminó completamente los fosfatos del medio en tan solo 3 días; sin embargo, solo eliminó el 87% de los nitratos en 7 días. La eliminación incompleta de los nitratos a 7 días se relaciona con la baja densidad algal obtenida con esta especie. Además, la concentración de nitratos permanece casi constante desde el tercer día hasta el séptimo, periodo en el que *C. vulgaris* alcanzó la fase de muerte. Estos resultados destacan la importancia de seleccionar la especie de microalga más adecuada para la composición específica del agua residual que se desea tratar, ya que no se puede afirmar que una especie sea adecuada para cualquier uso.

Con base en lo anteriormente expuesto, se empleará la especie *Scenedesmus* sp. para evaluar su potencial en la eliminación de CDEs como tratamiento terciario.

#### 4.4.3. Crecimiento de *Scenedesmus* sp. en ARR

La Figura 4 - 53 (a) presenta las curvas de crecimiento de *Scenedesmus* sp. durante 7 días en un volumen de ARR de 5 L, en presencia y ausencia de CDEs. Los experimentos se llevaron a cabo en condiciones LOM (en presencia de luz, aireación y microalga). Como se puede observar, *Scenedesmus* sp. alcanzó una densidad algal de 0,28 g/L a los 7 días en presencia de CDEs y de 0,18 g/L en ausencia de contaminantes. Cabe destacar que no se encontraron diferencias significativas ( $p>0,05$ ) en el crecimiento de esta especie durante los 4 primeros días, tanto en ausencia como en presencia de CDEs. Sin embargo, a día 7, *Scenedesmus* sp. alcanzó una densidad significativamente mayor en presencia de CDEs ( $p<0,05$ ). En la sección 4.2.1 ya se mencionó que la presencia de determinadas concentraciones de

CDEs no afecta al crecimiento de las microalgas e incluso podría mejorarlo. Por ejemplo, Pazmino-Sosa et al. (2024) encontraron que concentraciones por debajo de 0,3 mg/L de 17 $\alpha$ -etinilestradiol no afectaban al crecimiento de *S. obliquus* [334], y Kozlova et al. (2019) encontraron que concentraciones entre 5 y 50 ng/L de 17 $\beta$ -estradiol incrementaban la densidad celular de *S. quadricauda* en comparación al control sin contaminante [439].

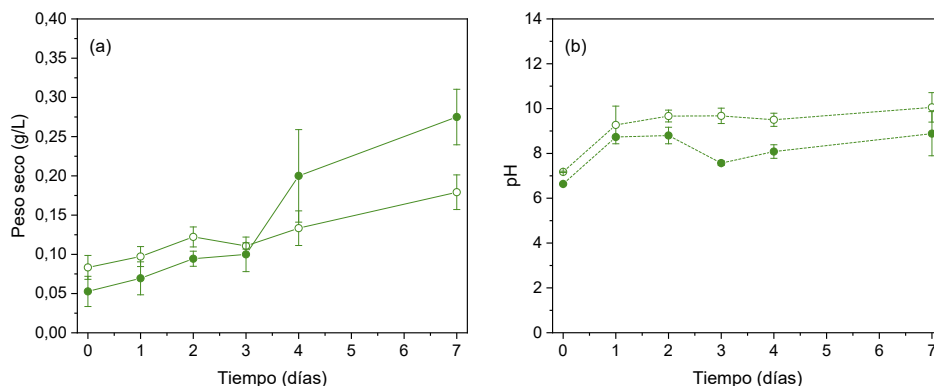


Figura 4 - 53. (a) Curvas de crecimiento durante 7 días para *Scenedesmus* sp en presencia (dopado – círculo sólido verde) y ausencia (control – círculo abierto verde) de CDEs en ARR. (b) Curvas de pH durante 7 días para el control (círculo abierto línea discontinua verde) y la muestra dopada (círculo sólido línea discontinua verde) de *Scenedesmus* sp.. Las barras de error representan la  $\pm$  desviación estándar de la media (n=3).

En cuanto a la variación del pH durante el experimento (Figura 4 - 53 (b)), se observó un ligero aumento durante el primer día tanto en ausencia como en presencia de CDEs, manteniéndose prácticamente constante hasta el final del experimento. Este incremento del pH se debe a la liberación de OH<sup>-</sup> al medio cuando la fuente de nitrógeno son los nitratos [365]. Sin embargo, en presencia de CDEs, el medio sufrió una ligera acidificación entre los días 2 y 3, para luego volver a aumentar hasta el día 7. No se encontraron diferencias significativas en el pH entre las condiciones con y sin CDEs ( $p > 0,05$ ), excepto en los días 3 y 4, donde se observó esa ligera acidificación en presencia de contaminantes. El intervalo de pH óptimo para *Scenedesmus* sp. se encuentra entre 6,5 y 8,5 [366], valor que se superó tanto en el control como en presencia de CDEs desde el día 1, por lo que no se trabajó en las condiciones óptimas de pH para favorecer el crecimiento de *Scenedesmus* sp. Sin embargo, aunque pH altos alteran la adsorción de metales traza y nutrientes por parte de la microalga, es preferible tener un medio alcalino para su cultivo. Estudios previos con *Scenedesmus* sp. demuestran que a pH 9 se obtuvo la segunda mayor densidad algal, solo por debajo de pH 8, al estudiar el efecto del pH en esta especie en un intervalo entre 7 y 9 [368].

Finalmente, la biomasa de *Scenedesmus* sp. cosechada a los 7 días en ausencia (control) y presencia de contaminantes se caracterizó estimando su composición

bioquímica y elemental. En la Tabla 4 - 37 se muestran los resultados obtenidos de la composición bioquímica. Los porcentajes de carbohidratos, proteínas y lípidos se encuentran dentro del rango habitual para esta especie [372,373,440]. La biomasa crecida en presencia de contaminantes presentó un contenido significativamente menor de carbohidratos y mayor de lípidos ( $p<0,05$ ) respecto del control. El aumento de lípidos en presencia de CDEs ya había sido recogido previamente en la bibliografía. Así, Mohy El-Din (2020) encontró que el contenido de lípidos se incrementó aproximadamente entre 1,4 y 1,5 veces cuando *N. salina* creció bajo condiciones de estrés por la presencia de nonilfenol y BPA, respectivamente [441]. Además, Li et al. (2020) observaron una disminución en el contenido de carbohidratos a medida que aumentaba la concentración de 17 $\beta$ -estradiol en un cultivo de *S. dimorphus* [256].

Tabla 4 - 37. Contenido en carbohidratos, lípidos, proteínas y cenizas para *Scenedesmus* sp. crecida en ARR en ausencia (control) y presencia (dopada) de CDEs. Los errores representan la  $\pm$  desviación estándar de la media ( $n=3$ ).

|                              | Control          | Dopada           |
|------------------------------|------------------|------------------|
| <b>Carbohidratos (% p/p)</b> | 24,41 $\pm$ 1,82 | 18,29 $\pm$ 1,82 |
| <b>Lípidos (% p/p)</b>       | 9,72 $\pm$ 0,26  | 13,57 $\pm$ 0,14 |
| <b>Proteínas (% p/p)</b>     | 61,03 $\pm$ 0,89 | 63,56 $\pm$ 1,79 |
| <b>Cenizas (% p/p)</b>       | 5,37 $\pm$ 0,18  | 4,57 $\pm$ 0,04  |

La composición elemental de la biomasa de *Scenedesmus* sp. cultivada en ARR sin contaminantes (control) y con contaminantes (dopada) durante 7 días se presenta en la Tabla 4 - 38. Como puede observarse, el contenido de N aumentó significativamente ( $p<0,05$ ) entre las muestras con contaminantes y el control, en favor de una disminución significativa ( $p<0,05$ ) del contenido de O. El resto de los porcentajes no se vio afectado por la presencia de CDEs.

Tabla 4 - 38. Composición elemental de la biomasa de *Scenedesmus* sp. crecida en ARR en ausencia (control) y presencia (dopada) de CDEs. Los errores representan la  $\pm$  desviación estándar de la media ( $n=3$ ).

|           | Control          | Dopada           |
|-----------|------------------|------------------|
| <b>%N</b> | 8,65 $\pm$ 0,05  | 5,58 $\pm$ 0,09  |
| <b>%C</b> | 50,39 $\pm$ 0,29 | 49,08 $\pm$ 0,93 |
| <b>%H</b> | 6,80 $\pm$ 0,05  | 6,75 $\pm$ 0,09  |
| <b>%S</b> | 0,16 $\pm$ 0,03  | 0,16 $\pm$ 0,03  |
| <b>%O</b> | 29,00 $\pm$ 0,74 | 33,43 $\pm$ 0,33 |

#### 4.4.4. Eliminación de nutrientes y CDEs

##### 4.4.4.1. Eliminación de nutrientes

La Figura 4 - 54 presenta los resultados obtenidos en la eliminación de nitratos y fosfatos para *Scenedesmus* sp. tanto en ausencia como en presencia de CDEs. Se observó una eliminación completa de fosfatos en 7 días en todos los casos, y una eliminación del 67% y del 88% de nitratos para el control y en presencia de

contaminantes, respectivamente. En particular, la eliminación de fosfatos fue más rápida en el control, alcanzándose el 100% de eliminación en tan solo 2 días; sin embargo, en presencia de contaminantes, la eliminación total de fosfatos se obtuvo al tercer día. Por otro lado, no se encontraron diferencias significativas en la eliminación de nitratos en ausencia y en presencia de CDEs, excepto para el día 4 ( $p < 0,05$ ), donde la microalga consumió más nitratos en presencia de CDEs. Este aumento en el consumo de nitratos coincidió con el aumento en el crecimiento que experimentó la microalga durante los últimos días (Figura 4 - 53 (a)). El hecho de que *Scenedesmus* sp. sea capaz de eliminar todo el contenido en fosfatos del medio sin eliminar el 100% de los nitratos presentes está en consonancia con estudios previos. En este sentido, Habibi et al. (2019) estudiaron la eliminación de nitratos y fosfatos con *Scenedesmus* sp. crecida en agua residual de matadero, partiendo de una concentración de nitratos de 100 mg/L y de fosfatos de 10 mg/L, obteniendo un 100% de eliminación de los fosfatos en 9 días y un 38% de eliminación de nitratos en 11 días [442]. Además, también se ha encontrado que *Scenedesmus* sp logró una eliminación del 100% del fósforo total presente en un lixiviado de vertedero nitrificado en 14 días, mientras que solo eliminó el 66,34% del nitrógeno total, que estaba compuesto por nitratos [443].

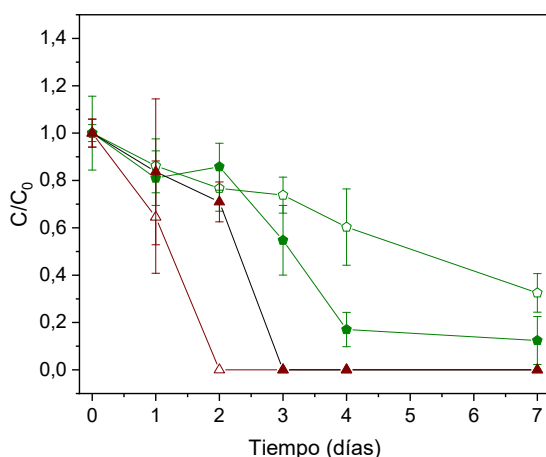


Figura 4 - 54. Eliminación de fosfatos (control – triángulo marrón abierto y ARR dopada – triángulo marrón cerrado) y nitratos (control – hexágono verde abierto y ARR dopada-hexágono verde cerrado) por *Scenedesmus* sp.. Las barras de error representan la  $\pm$  desviación estándar de la media ( $n=3$ ).

En la Figura 4 - 55 se muestran los resultados de eliminación de DQO con *Scenedesmus* sp. en ausencia (control) y en presencia de CDEs. El control de *Scenedesmus* sp. fue capaz de alcanzar una eliminación del 83 % de DQO en 7 días. Sin embargo, cuando estuvieron presentes los CDEs, la microalga solo logró eliminar aproximadamente el 20% de la DQO en ese tiempo. La elevada eliminación obtenida en el control es coherente con lo reportado en estudios previos [385,444]. Por el

contrario, la eliminación alcanzada en presencia de CDEs se encuentra por debajo de los valores publicados en la bibliografía.

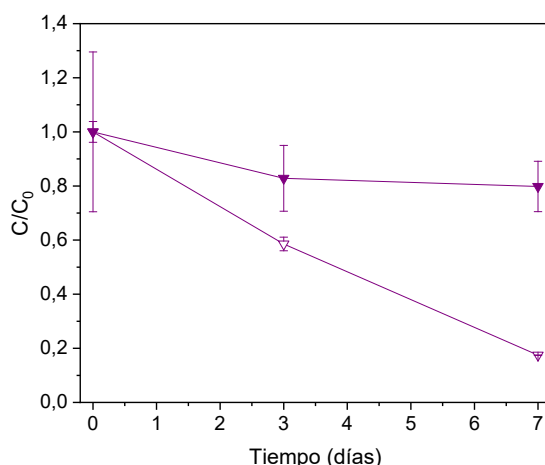


Figura 4 - 55. Eliminación de DQO (control – triángulo invertido morado abierto y ARR dopada – triángulo invertido morado cerrado) por *Scenedesmus* sp.. Las barras de error representan la  $\pm$  desviación estándar de la media (n=3).

Finalmente, una vez analizado el consumo de nutrientes, se ajustó el crecimiento de *Scenedesmus* sp. en ausencia (control) y en presencia de CDEs al modelo cinético de Monod, empleando como sustrato la concentración de nitratos. Los parámetros cinéticos obtenidos a partir de este ajuste se recogen en la Tabla 4 - 39.

Tabla 4 - 39. Parámetros cinéticos de Monod para *Scenedesmus* sp. cultivada en ARR y en ausencia (control) y presencia de CDEs.

| Especie                        | $\mu_{\max}$ (d <sup>-1</sup> ) (R <sup>2</sup> ) | K <sub>s</sub> (mg/L) (R <sup>2</sup> ) |
|--------------------------------|---------------------------------------------------|-----------------------------------------|
| <i>Scenedesmus</i> sp. control | 0,11 (0,971)                                      | 4,91 (0,986)                            |
| <i>Scenedesmus</i> sp. dopada  | 0,26 (0,974)                                      | 2,03 (0,995)                            |

En este caso, se obtuvo un valor de  $\mu_{\max}$  más elevado en presencia de CDEs, lo que concuerda con lo observado previamente en la Figura 4 - 53 (a), donde se registró un mayor crecimiento algal bajo estas condiciones. Además, el valor más bajo de K<sub>s</sub> en presencia de CDEs (2,03 mg/L frente a 4,91 mg/L en el control) indica una mayor afinidad por los nitratos en estas condiciones. Este comportamiento también se evidenció en la Figura 4 - 54, en la que se mostró una mayor eliminación de nitratos por parte de *Scenedesmus* sp. en presencia de CDEs. Cabe destacar que, a diferencia del cultivo previo. en ARS, donde la fuente de nitrógeno era amonio, en este caso donde cultivo de *Scenedesmus* sp. se realizó en ARR, con nitratos como fuente de nitrógeno, los valores obtenidos de  $\mu_{\max}$  se encuentran dentro del rango reportado en estudios previos para esta especie (entre 0,14 y 0,62 d<sup>-1</sup>). No obstante, el valor de K<sub>s</sub>

fue ligeramente inferior al mencionado en la bibliografía, que sitúa este parámetro entre 4,5 y 13,3 mg/L [388].

#### 4.4.4.2. Eliminación de CDEs

Se realizó un análisis del efecto de la luz, el oxígeno y la presencia de microalga en la eliminación de cada uno de los CDEs en ARR durante un periodo de 7 días, cuyos resultados se muestran en la Figura 4 - 56 (a)-(f).

Como se muestra en la Figura 4 - 56 (a), el MeP experimentó degradación abiótica (experimentos LO), alcanzando entre los días 1 y 4 una eliminación aproximada del 30-37%, para luego aumentar nuevamente su concentración a día 7. Este fenómeno coincidió con la degradación abiótica del PrP y el BuP (Figura 4 - 56 (b) y (c), respectivamente) que comenzó a partir del día 4, alcanzando eliminaciones finales del 44% para el primero y del 60% para el segundo. Estudios previos sugieren que, en determinadas condiciones, los parabenos de cadena larga, como el EtP, el PrP o el BuP, pueden sufrir una biotransformación a MeP, resultando en su eliminación por esa vía [445]. Es probable que, por este motivo, a partir del día 4, cuando comenzó la degradación abiótica del PrP y el BuP, se observase un aumento en la concentración de MeP. Por otro lado, la presencia de *Scenedesmus* sp. mejoró la eliminación de los parabenos, alcanzándose un 100% de degradación en los tres compuestos a los 7 días. Mientras que la eliminación de PrP y BuP (Figura 4 - 56 (b) y (c), respectivamente) se produjo desde el inicio del experimento de manera más rápida, alcanzando la eliminación completa aproximadamente en 3 días; no fue hasta ese momento cuando el MeP comenzó a degradarse también, logrando la eliminación completa a día 7. Esto refuerza la teoría de que el PrP y el BuP se degradaron hacia MeP, que mantuvo su concentración constante durante los primeros 3 días, para luego degradarse completamente una vez que no quedaba ni PrP ni BuP. Al comparar estos resultados con los obtenidos anteriormente utilizando ARS a escala de laboratorio, se observó también una completa degradación de los tres parabenos en presencia de *Scenedesmus* sp. en 7 días. Sin embargo, la degradación fue significativamente más rápida en el experimento con ARS (Figura 4 - 28). La degradación completa de estos parabenos en presencia de microalgas ya ha sido reportada en la bibliografía, aunque con concentraciones iniciales menores en comparación con este estudio. Como se mostró anteriormente en la Tabla 4 - 20, Zhou et al. (2014) lograron una eliminación del 100% de MeP y PrP utilizando *S. obliquus* en 7 días, con concentraciones iniciales de 47,4 ng MeP/L y 3,8 ng PrP/L [390]. Además, Song et al. (2017) consiguieron eliminaciones completas de MeP, PrP y BuP en 8 días empleando perifiton, compuesto principalmente por *Chlorophyta*, partiendo de una concentración inicial de 10 µg/L de cada parabeno [400]. En cuanto a la baja degradación abiótica obtenida con MeP, Vale et al. (2022) reportó una degradación abiótica de aproximadamente el 10% de MeP en 7 días, partiendo de una concentración inicial de 0,8 mg MeP/L [316].

En cuanto a la eliminación de BP, no se observó degradación abiótica (Figura 4 - 56 (d)). Este resultado es muy diferente al mostrado en la sección 4.2.2.2. (empleando ARS y un volumen menor), donde la degradación abiótica era la vía principal de eliminación de este compuesto. Esto puede deberse a las diferentes condiciones de aireación a las que se sometió a los experimentos realizados con ARR en los que se empleó un mayor volumen de agua para el cultivo. Concretamente estos experimentos se llevaron a cabo con una aireación de 0,7 mL O<sub>2</sub>/min por mL de cultivo, frente a los 12,15 mL O<sub>2</sub>/min de los experimentos a escala de laboratorio. Tal y como se explicó anteriormente, la degradación abiótica del BP fue atribuida a la presencia de ROS en el medio. Así, la menor aireación empleada en los experimentos con ARR pudo provocar que la menor concentración de oxígeno en el medio provocase una disminución de la cantidad de ROS presentes capaces de oxidar la BP, no produciéndose su degradación abiótica. Sin embargo, la presencia de *Scenedesmus* sp. sí mejoró la eliminación de BP, alcanzándose una degradación final a día 7 del 56%. Como se comentó previamente, los estudios de degradación de BP con microalgas son escasos y se centran principalmente en benzofenonas sustituidas, lo que dificulta la comparación de los resultados obtenidos. Por ejemplo, con *S. obliquus* se logró una degradación entre el 23,3 y el 28,5% con concentraciones iniciales de BP-3 entre 0,1 y 3 mg BP-3/L en 10 días, partiendo de una densidad algal de 0,014 g/L, lo que puede explicar la menor degradación obtenida respecto al presente estudio [401]. Resultados más similares a los obtenidos en este estudio fueron los de Mao et al. (2017), quienes lograron una degradación de aproximadamente el 50% en 10 días utilizando *Chlamydomonas reinhardtii* con una concentración inicial de 1 ppm de BP-3 [402]. Lee et al. (2020) también encontraron una baja degradación abiótica de BP-3, que representaba únicamente entre el 3,12 y el 8,64% de la eliminación total, lo que coincide con la baja degradación abiótica obtenida en el presente estudio [401].

El BPA no sufrió degradación abiótica significativa, alcanzando una eliminación de aproximadamente el 13% a los 7 días (Figura 4 - 56 (e)), un valor muy similar al obtenido en los experimentos con ARS a escala de laboratorio (Figura 4 - 31). Sin embargo, al incorporar *Scenedesmus* sp. en el medio, la eliminación de BPA fue completa a los 7 días, siendo más rápida a partir del segundo día. Comparando con los experimentos del sistema como tratamiento biológico (Figura 4 - 31), la eliminación de BPA con microalgas a los 7 días fue más elevada (100%). Estos resultados están alineados con la literatura previa, ya que, por ejemplo, con *S. obliquus* se ha llegado a obtener una eliminación del 99% de BPA en 7 días, partiendo de una concentración inicial aproximada de 20 ppb [390]. Además, Ouada et al. (2018) alcanzaron eliminaciones del 72% en 5 días usando otra *Chlorophyta*, la *Picocystis* sp., partiendo de una concentración de 25 mg BPA/L. De esa eliminación total, el 19,23% se correspondió con eliminación abiótica, porcentaje similar al obtenido en el presente estudio [417].

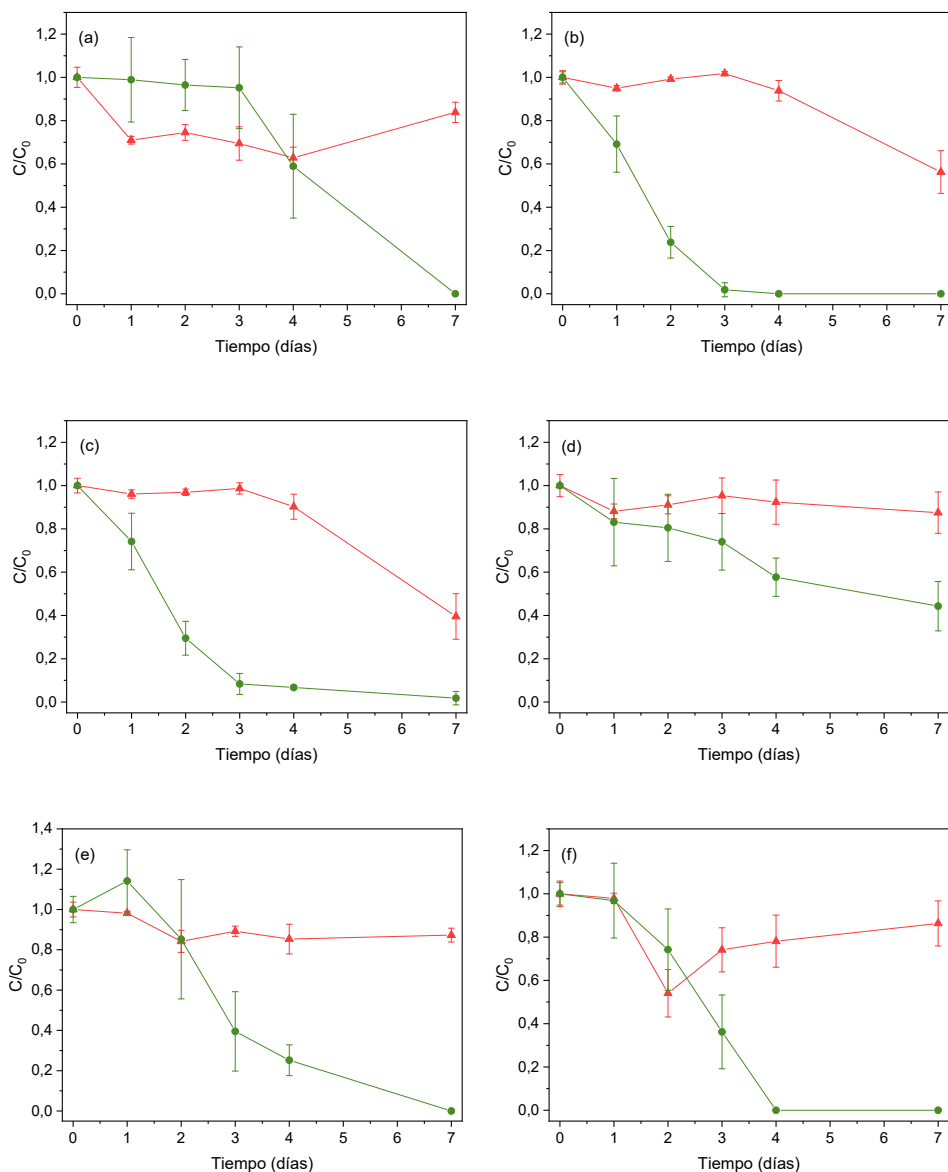


Figura 4 - 56. Eliminación de MeP (a), PrP (b), BuP (c), BP (d), BPA (e) y E (f): experimentos LO (triángulo rojo) y experimentos LOM con *Scenedesmus* sp. (círculo verde). Los experimentos se llevaron a cabo durante 7 días. Las barras de error representan la  $\pm$  desviación estándar de la media ( $n=3$ ).

Finalmente, como se muestra en la Figura 4 - 56, la degradación abiótica para E es despreciable (14% a día 7). De acuerdo con los resultados expuestos en la sección 4.2.2.2, la degradación abiótica de la E estaba favorecida en caso de que BP se estuviese degradando también. Como se ha comentado anteriormente, no se obtuvo degradación abiótica de BP, por lo que es lógico que tampoco se haya observado este fenómeno en E. Por el contrario, si *Scenedesmus* sp. estaba presente en el medio, se alcanzaba una total eliminación de este contaminante en 4 días. Si se comparan

estos resultados con los resultados mostrados para este contaminante con ARS, se obtuvo una mayor eliminación cuando se emplea ARR (100%, frente al 70% obtenido anteriormente) y exclusivamente debido a la presencia de la microalga. Estos elevados porcentajes de eliminación también han sido encontrados por otros autores, como Ruksrithong et al. (2019) los cuales obtuvieron que *S. obliquus* es capaz de eliminar el 91% de E en 16 días cuando la concentración inicial era de 5 µg E/L [261]. Además, Wang et al. (2019) alcanzaron eliminaciones del 97% con *S. quadricauda* en 40 días, partiendo de una concentración inicial de 5 ppm de E [398]. Finalmente, Sami et al. (2023) observaron que la degradación abiótica debida al efecto de parámetros físicos, tales como la temperatura o el pH, fue despreciable en la degradación de estrona, partiendo de una concentración de 20 ppm de E durante 6 días [446].

En general, como puede observarse en la Figura 4 - 56 (a)-(f), la degradación de estos CDEs, cuando se emplea el presente método basado en microalgas como tratamiento terciario, se debe a la presencia de *Scenedesmus* sp., apreciándose únicamente degradación abiótica en el caso del PrP y el BuP. De este modo, los resultados obtenidos muestran el potencial de esta especie para ser empleada en un tratamiento terciario para la eliminación de CDEs.

#### A) Estudio cinético del proceso

A partir de las curvas de eliminación mostradas anteriormente, se estimaron las constantes cinéticas de degradación de cada uno de los CDEs suponiendo una cinética de pseudo-primer orden. Además, se calcularon los tiempos de vida medios de cada uno de los compuestos estudiados. Todos estos cálculos se realizaron para los experimentos en presencia de microalga, ya que, como se indicó anteriormente, la eliminación abiótica puede considerarse despreciable.

En la Tabla 4 - 40 se presentan los resultados de las constantes cinéticas y los tiempos de vida medios para cada uno de los CDEs en presencia de *Scenedesmus* sp. Entre los parabenos, el PrP fue el que presentó la constante cinética más alta, alcanzando su eliminación completa en solo 3 días. En consecuencia, también presentó el tiempo medio de vida más bajo. En contraste, para MeP se obtuvo la constante cinética más baja y el tiempo de vida medio más alto entre los parabenos, de 121,6 h. Por otro lado, el BuP se encontraba entre estos dos extremos, con un tiempo de vida medio de 27,5 h.

En cuanto a la BP, fue el compuesto la constante cinética más baja, lo que se tradujo en el tiempo de vida medio más alto. Esto indica que fue el compuesto más difícil de eliminar bajo las condiciones estudiadas. Por otro lado, el BPA y la E mostraron constantes cinéticas y tiempos de vida medio muy similares, reflejando patrones de eliminación muy parecidos, como se observa en la Figura 4 - 56.

Tabla 4 - 40. Constantes de degradación ( $k$ ) y tiempos de vida medios ( $t_{1/2}$ ) estimados para la biodegradación de CDEs empleando una cinética de pseudo-primer orden.

|            | $k_{\text{LOM}} (\text{h}^{-1}) (R^2)$ | $t_{1/2} \text{ LOM (h)}$ |
|------------|----------------------------------------|---------------------------|
| <b>MeP</b> | $5,7 \cdot 10^{-3} (0,817)$            | 121,6                     |
| <b>PrP</b> | $5,4 \cdot 10^{-2} (0,875)$            | 12,8                      |
| <b>BuP</b> | $2,5 \cdot 10^{-2} (0,982)$            | 27,5                      |
| <b>BP</b>  | $4,8 \cdot 10^{-3} (0,969)$            | 144,4                     |
| <b>BPA</b> | $1,6 \cdot 10^{-2} (0,850)$            | 43,6                      |
| <b>E</b>   | $1,4 \cdot 10^{-2} (0,821)$            | 50,2                      |

## B) Análisis de los productos de degradación obtenidos

Al igual que se hizo para los experimentos descritos en la sección 4.2.2.2, para evaluar la degradación de los CDEs en ARR se recogieron diariamente muestras de los experimentos abióticos (experimentos LO, en presencia de luz y aireación) y de los experimentos con *Scenedesmus* sp. (experimentos LOM), para ser posteriormente analizadas por HPLC.

En la Figura 4 - 57 se presentan los cromatogramas obtenidos al trabajar con el método 1 (isocrático). Como se puede observar, solo se encontraron picos adicionales en los experimentos de degradación abiótica a 210 nm (Figura 4 - 57 (b)), que se corresponden con los *productos A y B*, cuyos tiempos de retención fueron de aproximadamente 3,1 y 5,4 minutos, respectivamente. Por otro lado, en los experimentos con *Scenedesmus* sp. apareció a 254 nm otro pico con un tiempo de retención de 2,8 minutos (Figura 4 - 57 (c)), *producto C*, y otro a 210 nm (Figura 4 - 57 (d)), *producto D*, cuyo tiempo de retención es muy similar al del *producto B*, pero sus espectros UV-visible no eran iguales.

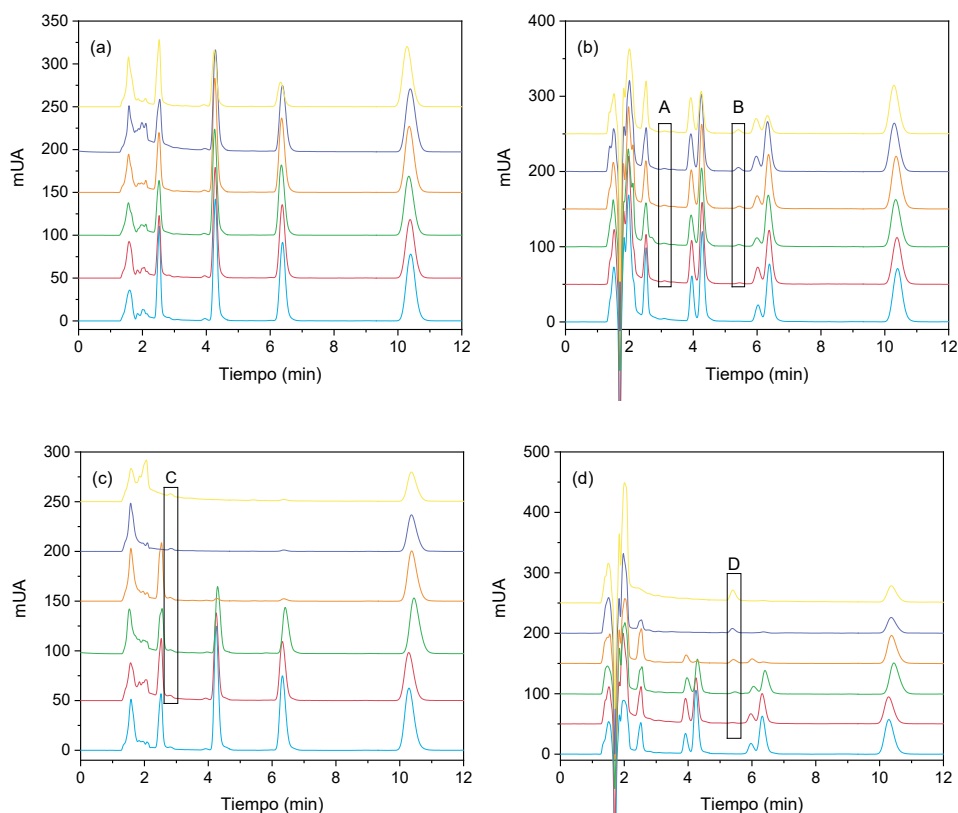


Figura 4 - 57. Cromatogramas para el método 1 isocrático de los experimentos LO a (a) 254 nm y (b) 210 nm y LOM con *Scenedesmus* sp. a (c) 254 nm y (d) 210 nm para los días 0 (azul), 1 (rojo), 2 (verde), 3 (naranja), 4 (morado) y 7 (amarillo).

La señal del *producto A* fue tan baja que no se pudo conseguir el espectro UV-visible de este compuesto. El *compuesto B* (Figura 4 - 58 (a)) presentó un máximo principal a 220 nm, característico de los compuestos con sistemas aromáticos, y un hombro débil entre 250 y 280 nm, indicativa de un grupo carbonilo, como cetonas o ácidos carboxílicos. Por su lado, el espectro UV-visible del *producto C* (Figura 4 - 58 (b)) fue muy similar a la del *producto K* obtenido en los experimentos con ARS (Figura 4 - 40 (c)), con un único máximo alrededor 250 nm, característico de compuestos que contienen anillos aromáticos conjugados [404]. Finalmente, el espectro UV-visible del *compuesto D* (Figura 4 - 58 (c)) fue similar al de los *productos F, G y J* de los experimentos con ARS (Figura 4 - 38 (a) y (b) y Figura 4 - 40 (b), respectivamente). Todos estos compuestos no presentaron un máximo de absorción claramente marcado, sin embargo, comparten hombro situado a 230 nm y otro a 280 nm.

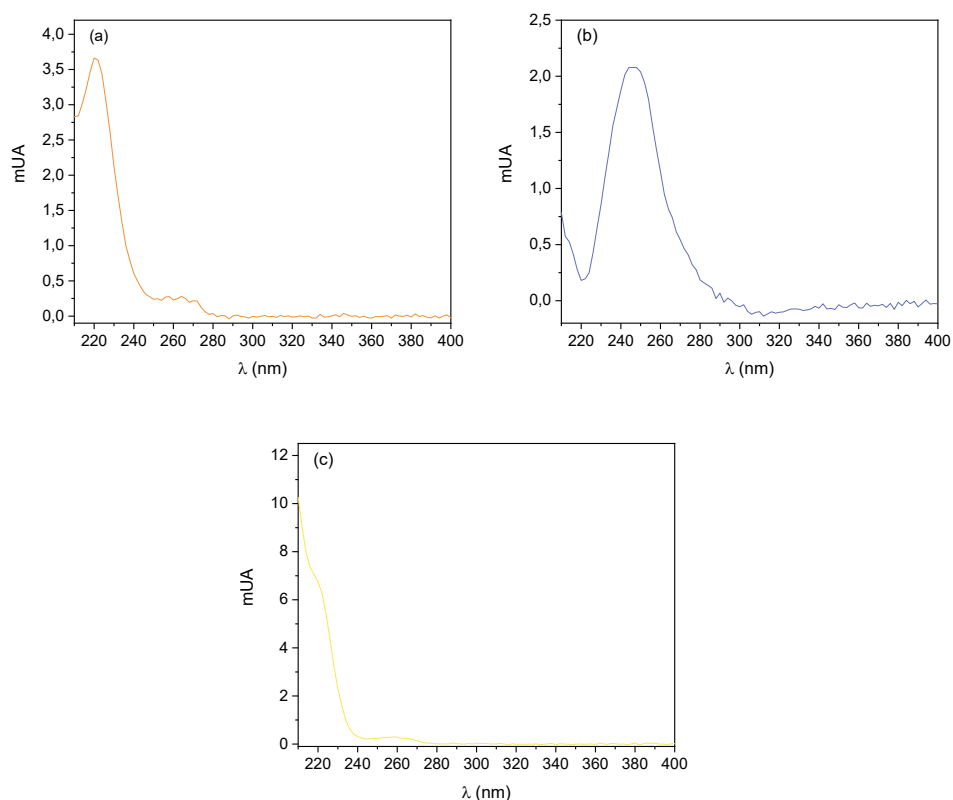


Figura 4 - 58. Espectro UV- visible de: (a) el producto B, (b) el producto C y (c) el producto D.

En los cromatogramas obtenidos de los experimentos abióticos empleando el método de cromatografía 2 (en gradiente) no se observaron picos adicionales a los de los analitos de interés (Figura 4 - 59 (a)). Esto refuerza la teoría de que los dos únicos CDEs que se degradaron abióticamente, PrP y BuP, lo hicieron hacia MeP. Por el contrario, en presencia de *Scenedesmus* sp. se encontró un producto de degradación (Figura 4 - 59 (b)) a un tiempo de retención aproximado de 1,64 minutos, denominado a partir de ahora como *producto E*.

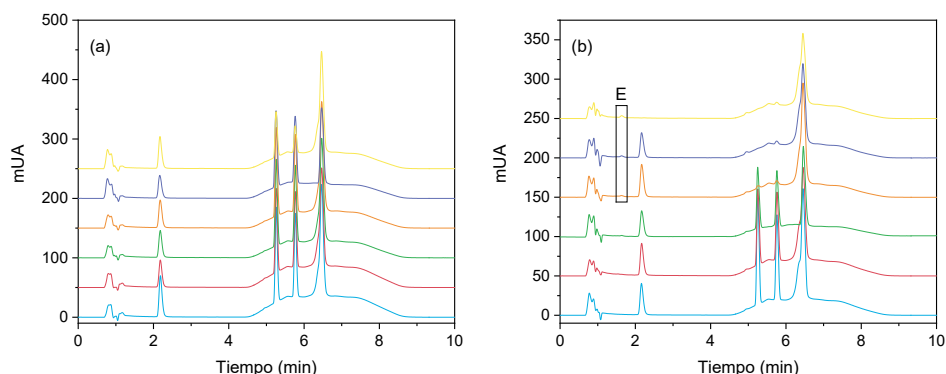


Figura 4 - 59. Cromatogramas para el método 2 en gradiente de los experimentos LO a (a) 254 nm y LOM con *Scenedesmus* sp. a (b) 254 nm para los días 0 (azul), 1 (rojo), 2 (verde), 3 (naranja), 4 (morado) y 7 (amarillo).

Este producto de degradación aparece a un tiempo de retención muy similar al *producto J* en las mismas condiciones para los experimentos en ARS (Figura 4 - 40 (b))Figura 4 - 39 Además, espectro UV-visible de este compuesto, mostrado en la Figura 4 - 60, también es muy similar al de los *productos de degradación F, G y J*, encontrados en los experimentos en ARS (Figura 4 - 38 (a) y (b) y Figura 4 - 40 (b), respectivamente) y al del *producto D* previo. Este espectro es compatible con productos de degradación típicos de los CDEs empleados, como ya se explicó previamente.

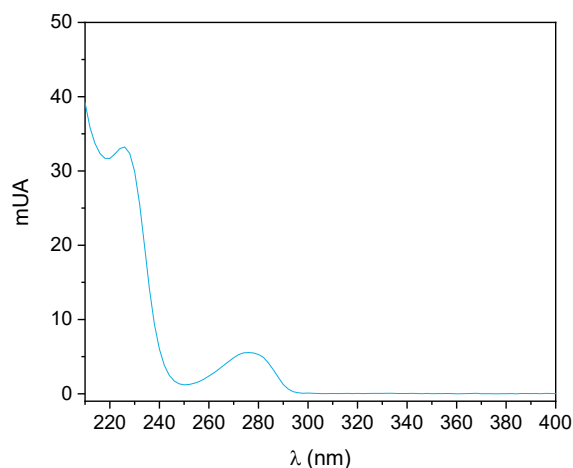


Figura 4 - 60. Espectro UV- visible del producto A.

En conclusión, los productos de degradación presentados en este apartado mostraron espectros UV-visible con máximos de absorbancia similares, en torno a 220 nm, entre 240 y 260 nm y a 280 nm. Estas bandas son características de la

presencia de anillos aromáticos y grupos carbonilo conjugados, como aldehídos o cetonas aromáticas. Esto, como se presentó en la sección 4.2.2.2, coincide con la naturaleza de varios compuestos identificados previamente en literatura como productos de degradación de estos CDEs. Tales como el ácido benzoico, las hidroxibenzofenonas, el 4-hidroxibenzoato o el ácido piridinestrónico.

**05**

**CONCLUSIONES**



## 5. Conclusiones

A partir de la experimentación llevada a cabo en esta tesis doctoral, centrada en el estudio de sistemas basados en microalgas para la eliminación simultánea de nutrientes y CDEs en aguas residuales, así como en la posterior valorización de la biomasa algal para la producción de biogás en un enfoque de biorrefinería, se han obtenido las siguientes conclusiones, organizadas por capítulo de resultados:

### 1. Desarrollo de un método analítico para la detección de CDEs en aguas residuales

- Los dos métodos cromatográficos desarrollados mediante HPLC-DAD permiten una cuantificación precisa, eficiente y reproducible de los seis CDEs seleccionados. El método 1, isocrático, resulta adecuado para PrP, BuP, BP, BPA y E, mientras que el MeP requiere el método 2, en gradiente, que mejora su retención mediante una mayor polaridad de la fase móvil y menor temperatura de columna. Estos métodos ofrecen una excelente simetría, separación y resolución de picos, así como una alta eficiencia de columna. Además, también presentan buena linealidad ( $R^2 > 0,99$ ) y precisión a la hora de determinar las concentraciones presentes en las muestras (errores  $< 7\%$ ), lo que confirma su robustez para el análisis simultáneo de esta mezcla de contaminantes.
- El estudio de variables del método de extracción en fase sólida (SPE) indica que el cartucho con 500 mg de adsorbente C18 proporciona las mejores recuperaciones. Además, el pH más adecuado depende del volumen de elución: a 0,5 mL, un pH de 4,5 mejora las recuperaciones de los diferentes CDEs, mientras que con 10 mL, el pH de 7 resulta más favorable. En general, volúmenes altos de elución (10 mL) ofrecen mejores resultados de recuperación. En cuanto al volumen de muestra, cada CDEs muestra un comportamiento específico: MeP, BPA y PrP presentan mejores recuperaciones con 10 mL, mientras que BuP y BP se ven favorecidos por 100 mL. Para E no se identifica una tendencia clara, siendo su recuperación en algunos casos independiente del volumen de muestra, y en otros, mayor con 100 mL.
- La selección final de condiciones para la SPE combina eficiencia analítica y viabilidad experimental, siendo el óptimo: 500 mg de adsorbente, 30 mL de volumen de muestra, pH de 7 y 2 mL de metanol como eluyente, con un factor de concentración de 15. Estas condiciones permiten recuperaciones superiores al 100% para la mayoría de los compuestos, excepto MeP ( $\approx 40\%$ ), cuya alta solubilidad en agua limita su retención. Aun así, se considera un compromiso aceptable al tratarse de un análisis multicomponente. El método presenta una buena linealidad ( $R^2 > 0,99$  para la mayoría de los

compuestos) y reproducibilidad, sin alcanzar el punto de ruptura dentro del intervalo de concentraciones de trabajo (1 ppm a 25 ppb), lo que garantiza su fiabilidad para el análisis cuantitativo de CDEs en muestras acuosas.

- El método combinado de SPE y HPLC-DAD desarrollado es aplicable con éxito a muestras reales, tanto en ausencia como en presencia de microalgas. En condiciones abióticas (en presencia solo de luz y oxígeno), las recuperaciones se mantienen cercanas al 100%, mientras que al incluir la biomasa algal se observan pérdidas asociadas a la retención de contaminantes en el filtro. Aun así, este paso es necesario para evitar la obstrucción del cartucho de SPE. Además, los subproductos de degradación no interfieren con la cuantificación de los CDEs. Finalmente, la obtención de calibrados con  $R^2 \geq 0,99$  (excepto MeP) en agua residual real confirma la aplicabilidad del método para su aplicación en matrices complejas.

## 2. Evaluación de un sistema basado en microalgas como tratamiento biológico

- Aunque tanto *Scenedesmus* sp. como *C. vulgaris* son capaces de crecer en ARS rica en amonio, *C. vulgaris* muestra una mayor adaptación y productividad. La presencia de CDEs no afecta negativamente a al crecimiento ni a la evolución del pH, e incluso mejora ligeramente el crecimiento de la biomasa en etapas finales.
- La exposición a 1 ppm de CDEs no modifica de forma apreciable la composición bioquímica y elemental ni el potencial Zeta de las microalgas estudiadas, lo que sugiere una buena tolerancia de ambas especies a estos contaminantes durante su cultivo.
- Pese a que ambas microalgas son capaces de eliminar nutrientes del ARS, *C. vulgaris* presenta una mayor eficiencia, eliminando completamente amonio y fosfatos en 7 días, tanto en ausencia como en presencia de CDEs. En el caso de *Scenedesmus* sp., la eliminación de fosfatos también es completa, pero su baja afinidad por el amonio limita su capacidad de eliminación de este compuesto, especialmente en presencia de CDEs. Además, la eliminación de DQO se ve favorecida por la presencia de CDEs en ambas especies, alcanzándose porcentajes del 100% en 7 días.
- Los ajustes del crecimiento al modelo de Monod reflejan una mayor  $\mu_{\max}$  y una menor  $K_s$  para *C. vulgaris*, lo que confirma su mayor afinidad por el amonio. Para esta especie, la presencia de CDEs mejora ligeramente su capacidad de crecimiento y su afinidad por el sustrato.
- Los parabenos (MeP, PrP y BuP) se degradan completamente mediante biodegradación en menos de dos días con ambas especies de microalgas, siendo *C. vulgaris* especialmente eficaz para MeP. Mientras que BP muestra una degradación preferentemente abiótica, E combina degradación abiótica con biodegradación. Finalmente, en el caso de BPA la presencia de microalgas también incrementa notablemente su eliminación.

- Los resultados obtenidos demuestran la idoneidad de *C. vulgaris* para ser empleada como tratamiento biológico (secundario) en la depuración del efluente del primario. Esta especie muestra un elevado crecimiento en agua residual sintética rica en amonio, eliminando completamente los nutrientes presentes en 7 días y logrando altas tasas de degradación de los CDEs. Todo ello la posiciona como una prometedora candidata para aplicaciones a mayor escala.
- El estudio cinético del proceso indica una mejora en las velocidades de degradación y una reducción de los tiempos de vida media en presencia de microalgas.
- Los productos de degradación identificados durante el proceso de eliminación de los CDEs presentan estructuras similares a los contaminantes originales y potencialmente grupos funcionales que caracterizan a los productos de degradación típicos de estos CDEs. Además, existen diferencias en los productos de degradación entre ambas microalgas, lo que apunta a que las rutas de eliminación son distintas.
- El estudio de la actividad enzimática sugiere que la eliminación de PrP y BuP implica a las enzimas extracelulares. Además, se encuentra que otros mecanismos como la acción de especies activas de oxígeno (ROS) o la liberación de materia orgánica extracelular (AEOM), también podrían desempeñar un papel relevante en la biodegradación de algunos CDEs.
- El análisis de las vías de eliminación de los CDEs mostró que la bioeliminación es el principal mecanismo implicado en la degradación de los parabenos, especialmente con *C. vulgaris*, mientras que en *Scenedesmus* sp. se observaron pequeñas contribuciones adicionales de bioadsorción y bioacumulación. En el caso de BP y de E, la degradación abiótica es importante, siendo la vía principal de eliminación del primero, mientras que con E se combinó también con la biodegradación. Por su parte, BPA sufre una degradación mayoritariamente debida a la presencia de microalga, con pequeñas contribuciones de bioadsorción y bioacumulación. En general, los mecanismos de bioadsorción y bioacumulación presentaron una contribución menor para todos los compuestos analizados.

### 3. Valorización de la biomasa algal: digestión anaerobia

- La aplicación del pretratamiento hidrotérmico resulta efectiva para mejorar la biodegradabilidad de la biomasa algal, favoreciendo la ruptura de la pared celular y la liberación de compuestos intracelulares. Esta mejora se observa en el aumento significativo de la DQO, el amonio y los fosfatos solubles al emplear las especies de microalgas estudiadas.
- La producción de metano (BMP) está favorecida por la aplicación del pretratamiento hidrotérmico para la biomasa de *Scenedesmus* sp. y *C. vulgaris*. En ambos casos, se obtiene 1,3 y 1,5 veces más metano con

*Scenedesmus* sp. y *C. vulgaris*, respectivamente, respecto a la biomasa sin pretratar.

#### 4. Evaluación de un sistema basado en microalgas como tratamiento terciario

- *Scenedesmus* sp. es la especie más adecuada para evaluar la eliminación de CDEs como tratamiento terciario en ARR. Esta especie presenta una mayor adaptación al cultivo en este medio, alcanzando concentraciones de biomasa significativamente superiores a *C. vulgaris*. Esto se atribuye a la preferencia de *Scenedesmus* sp. por los nitratos como fuente de nitrógeno.
- *Scenedesmus* sp. es capaz de crecer en ARR tanto en ausencia como en presencia de CDEs, alcanzando incluso mayor densidad a los 7 días en presencia de contaminantes. Sin embargo, la biomasa cultivada en presencia de CDEs presenta un mayor contenido de lípidos y un menor contenido de carbohidratos, lo que sugiere un posible efecto de estrés inducido por la presencia de los contaminantes.
- El cultivo de *Scenedesmus* sp. alcanza una eliminación eficaz de nutrientes, especialmente fosfatos, hasta su completa desaparición en todos los casos a los 7 días. La eliminación de nitratos por *Scenedesmus* sp. es del 67% en ausencia de CDEs y del 88% en presencia de CDEs. Respecto a la DQO, su eficiencia de eliminación disminuye drásticamente en presencia de contaminantes.
- El empleo de un sistema basado en *Scenedesmus* sp. como tratamiento terciario permite eliminar completamente MeP, PrP, BuP, BPA y E en ARR en 7 días y reduce en un 56% la concentración de BP. La eliminación abiótica es despreciable en la mayoría de los casos, confirmando la idoneidad de esta especie para ser empleada en un tratamiento terciario del agua residual estudiada.

## 5.1. Recomendaciones futuras

A partir de la discusión de los resultados y de las conclusiones obtenidas se proponen las siguientes líneas de investigación futura con el objetivo de completar, optimizar y escalar los procesos desarrollados en la presente tesis doctoral:

1. **Escalado del proceso de tratamiento biológico con microalgas** a fotobiorreactores en discontinuo de mayor capacidad, tanto en agua residual sintética como en agua residual real procedente de la salida de la decantación primaria. Este escalado permitiría evaluar el efecto del volumen de cultivo sobre el crecimiento de las microalgas, así como en la eliminación de nutrientes y de CDEs, comparando además el comportamiento del sistema en ambas matrices para identificar diferencias significativas entre medios sintéticos y reales.
2. **Implementación del proceso en continuo** (tanto como tratamiento biológico como terciario), para estudiar cómo influye este modo de operación en la eliminación de los CDEs. Se recomienda además analizar el efecto de distintos caudales de alimentación sobre el crecimiento de la biomasa y la degradación de contaminantes.
3. **Estudio sobre la generación de especies reactivas de oxígeno (ROS)** durante el cultivo debido a la presencia de aireación, para comprender su papel en la degradación abiótica de los contaminantes.
4. **Profundizar en el estudio de los mecanismos de eliminación de los CDEs por parte de las microalgas**, mediante la identificación de las principales rutas metabólicas implicadas en su biodegradación, lo que permitiría comprender mejor el destino final de estos compuestos y optimizar su eliminación.
5. **Optimización del proceso de eliminación de CDEs** explorando diferentes condiciones operativas (fotoperiodos, presencia/ausencia de aireación) y la selección de otras especies de microalgas con potencial para eliminar este tipo de contaminantes.
6. **Evaluación del efecto de concentraciones más elevadas de CDEs** sobre el crecimiento de las microalgas, la eliminación de nutrientes y de contaminantes, así como de los principales mecanismos de degradación de estos compuestos.
7. **Caracterización avanzada de los productos de degradación** generados durante el proceso, empleando técnicas de cromatografía acopladas a espectrometría de masas (LC-MS/MS o GC-MS) para su identificación estructural.
8. **Desarrollo de un estudio tecnoeconómico y medioambiental** del proceso basado en los datos cinéticos de crecimiento y eliminación de CDEs, mediante análisis de ciclo de vida (ACV) que permita evaluar su viabilidad a escala industrial y su impacto medioambiental.



06

**BIBLIOGRAFÍA**



## 6. Bibliografía

1. Abdelfattah, A.; Ali, S.S.; Ramadan, H.; El-Aswar, E.I.; Eltawab, R.; Ho, S.H.; Elsamahy, T.; Li, S.; El-Sheekh, M.M.; Schagerl, M.; et al. Microalgae-Based Wastewater Treatment: Mechanisms, Challenges, Recent Advances, and Future Prospects. *Environ. Sci. Ecotechnology* 2023, 13, 100205, doi:10.1016/j.esec.2022.100205.
2. Mishra, R.K. Fresh Water Availability and Its Global Challenge. *Br j multidiscip adv stud* 2023, 4, 1–78, doi:10.37745/bjmas.2022.0208.
3. Plöhn, M.; Spain, O.; Sirin, S.; Silva, M.; Escudero-Oñate, C.; Ferrando-Climent, L.; Allahverdiyeva, Y.; Funk, C. Wastewater Treatment by Microalgae. *Physiol Plant* 2021, 173, 568–578, doi:10.1111/ppl.13427.
4. Silva, J.A. Wastewater Treatment and Reuse for Sustainable Water Resources Management: A Systematic Literature Review. *Sustainability (Switzerland)* 2023, 15, 10940, doi:10.3390/su151410940.
5. Marques, A.C.; Veras, C.E.; Rodriguez, D.A. Assessment of Water Policies Contributions for Sustainable Water Resources Management under Climate Change Scenarios. *J Hydrol (Amst)* 2022, 608, 127690, doi:10.1016/j.jhydrol.2022.127690.
6. Li, K.; Liu, Q.; Fang, F.; Luo, R.; Lu, Q.; Zhou, W.; Huo, S.; Cheng, P.; Liu, J.; Addy, M.; et al. Microalgae-Based Wastewater Treatment for Nutrients Recovery: A Review. *Bioresour Technol* 2019, 291, 121934, doi:10.1016/j.biortech.2019.121934.
7. Kavva, M.; Mathew, A.; Shekar, P.R.; P, S. Short Term Water Demand Forecast Modelling Using Artificial Intelligence for Smart Water Management. *Sustain Cities Soc* 2023, 95, 104610, doi:10.1016/j.scs.2023.104610.
8. Wollmann, F.; Dietze, S.; Ackermann, J.U.; Bley, T.; Walther, T.; Steingroewer, J.; Krujatz, F. Microalgae Wastewater Treatment: Biological and Technological Approaches. *Eng Life Sci* 2019, 19, 860–871, doi:10.1002/elsc.201900071.
9. Mohsenpour, S.F.; Hennige, S.; Willoughby, N.; Adeloye, A.; Gutierrez, T. Integrating Micro-Algae into Wastewater Treatment: A Review. *Science of the Total Environment* 2021, 752, 142168, doi:10.1016/j.scitotenv.2020.142168.
10. Sainz Lastre, J.A. *Tecnologías Para La Sostenibilidad: Procesos y Operaciones Unitarias En Depuración de Aguas Residuales*; Fundación EOI.; Madrid, 2005; ISBN 848872358X.

11. Zagklis, D.P.; Bampos, G. Tertiary Wastewater Treatment Technologies: A Review of Technical, Economic, and Life Cycle Aspects. *Processes* 2022, *10*, 2304, doi:10.3390/pr10112304.
12. Ahn, C.; Jeung, E.B. Endocrine-Disrupting Chemicals and Disease Endpoints. *Int. J. Mol. Sci.* 2023, *24*, 5342, doi:10.3390/ijms24065342.
13. Ahmed, M.B.; Zhou, J.L.; Ngo, H.H.; Guo, W.; Thomaidis, N.S.; Xu, J. Progress in the Biological and Chemical Treatment Technologies for Emerging Contaminant Removal from Wastewater: A Critical Review. *J Hazard Mater* 2017, *323*, doi:10.1016/j.jhazmat.2016.04.045.
14. Sumpter, J.P. Endocrine Disrupters in the Aquatic Environment: An Overview. *Acta Hydroch. Hydrob.* 2005, *33*, 9–16, doi:10.1002/aheh.200400555.
15. Kasonga, T.K.; Coetzee, M.A.A.; Kamika, I.; Ngole-Jeme, V.M.; Benteke Momba, M.N. Endocrine-Disruptive Chemicals as Contaminants of Emerging Concern in Wastewater and Surface Water: A Review. *J Environ Manage* 2021, *277*, doi:10.1016/j.jenvman.2020.111485.
16. Wang, P.; Rene, E.R.; Yan, Y.; Ma, W.; Xiang, Y. Spatiotemporal Evolvment and Factors Influencing Natural and Synthetic EDCs and the Microbial Community at Different Groundwater Depths in the Chaobai Watershed: A Long-Term Field Study on a River Receiving Reclaimed Water. *J Environ Manage* 2019, *246*, 647–657, doi:10.1016/j.jenvman.2019.05.156.
17. Brueller, W.; Inreiter, N.; Boegl, T.; Rubasch, M.; Saner, S.; Humer, F.; Moche, W.; Schuhmann, A.; Hartl, W.; Brezinka, C.; et al. Occurrence of Chemicals with Known or Suspected Endocrine Disrupting Activity in Drinking Water, Groundwater and Surface Water, Austria 2017/2018. *Bodenkultur* 2018, *69*, 155–173, doi:10.2478/boku-2018-0014.
18. Archer, E.; Wolfaardt, G.M.; van Wyk, J.H. Pharmaceutical and Personal Care Products (PPCPs) as Endocrine Disrupting Contaminants (EDCs) in South African Surface Waters. *Water SA* 2017, *43*, 684–706, doi:10.4314/wsa.v43i4.16.
19. Arditoglou, A.; Voutsas, D. Occurrence and Partitioning of Endocrine-Disrupting Compounds in the Marine Environment of Thermaikos Gulf, Northern Aegean Sea, Greece. *Mar Pollut Bull* 2012, *64*, 2443–2452, doi:10.1016/j.marpolbul.2012.07.048.
20. Chiriac, F.L.; Pirvu, F.; Paun, I. Investigation of Endocrine Disruptor Pollutants and Their Metabolites along the Romanian Black Sea Coast: Occurrence, Distribution and Risk Assessment. *Environ Toxicol Pharmacol* 2021, *86*, 103673, doi:10.1016/j.etap.2021.103673.

21. Lu, S.; Lin, C.; Lei, K.; Xin, M.; Wang, B.; Ouyang, W.; Liu, X.; He, M. Endocrine-Disrupting Chemicals in a Typical Urbanized Bay of Yellow Sea, China: Distribution, Risk Assessment, and Identification of Priority Pollutants. *Environ. Pollut.* 2021, *287*, 117588, doi:10.1016/j.envpol.2021.117588.
22. Finckh, S.; Buchinger, S.; Escher, B.I.; Hollert, H.; König, M.; Krauss, M.; Leekitratanapisan, W.; Schiwy, S.; Schlichting, R.; Shuliakevich, A.; et al. Endocrine Disrupting Chemicals Entering European Rivers: Occurrence and Adverse Mixture Effects in Treated Wastewater. *Environ Int* 2022, *170*, 107608, doi:10.1016/j.envint.2022.107608.
23. Silori, R.; Kumar, M.; Madhab Mahapatra, D.; Biswas, P.; Prakash Vellanki, B.; Mahlknacht, J.; Mohammad Tauseef, S.; Barcelo, D. Prevalence of Endocrine Disrupting Chemicals in the Urban Wastewater Treatment Systems of Dehradun, India: Daunting Presence of Estrone. *Environ Res* 2023, *235*, 116673, doi:10.1016/j.envres.2023.116673.
24. Saha, S.; Narayanan, N.; Singh, N.; Gupta, S. Occurrence of Endocrine Disrupting Chemicals (EDCs) in River Water, Ground Water and Agricultural Soils of India. *Int. J. Environ. Sci. Technol.* 2022, *19*, 11459–11474, doi:10.1007/s13762-021-03858-2.
25. Chafi, S.; Azzouz, A.; Ballesteros, E. Occurrence and Distribution of Endocrine Disrupting Chemicals and Pharmaceuticals in the River Bouregreg (Rabat, Morocco). *Chemosphere* 2022, *287*, 132202, doi:10.1016/j.chemosphere.2021.132202.
26. Zhang, Y.; Cao, J.; Ke, T.; Tao, Y.; Wu, W.; Wang, P.; Zhou, M.; Chen, L. Pollution Characteristics and Risk Prediction of Endocrine Disruptors in Lakes of Wuhan. *Toxics* 2022, *10*, 93, doi:10.3390/toxics10020093.
27. Russo, G.; Laneri, S.; Di Lorenzo, R.; Ferrara, L.; Grumetto, L. The Occurrence of Selected Endocrine-Disrupting Chemicals in Water and Sediments from an Urban Lagoon in Southern Italy. *Water Environ. Res.* 2021, *93*, 1944–1958, doi:10.1002/wer.1566.
28. Pal, A.; He, Y.; Jekel, M.; Reinhard, M.; Gin, K.Y.H. Emerging Contaminants of Public Health Significance as Water Quality Indicator Compounds in the Urban Water Cycle. *Environ Int* 2014, *71*, 46–62, doi:10.1016/j.envint.2014.05.025.
29. National Institute of Environmental Health Sciences: Endocrine Disruptors Available online: <https://www.niehs.nih.gov/health/topics/agents/endocrine> (accessed on 26 August 2024).

30. Kavlock, R.J.; Daston, G.P.; DeRosa, C.; Fenner-Crisp, P.; Gray, L.E.; Kaattari, S.; Lucier, G.; Luster, M.; Mac, M.J.; Maczka, C.; et al. Research Needs for the Risk Assessment of Health and Environmental Effects of Endocrine Disruptors: A Report of the U.S. EPA-Sponsored Workshop. *Environ Health Perspect* 1996, *104*, 715–740, doi:10.2307/3432708.
31. Schug, T.T.; Janesick, A.; Blumberg, B.; Heindel, J.J. Endocrine Disrupting Chemicals and Disease Susceptibility. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 2011, *127*, 204–215, doi:10.1016/j.jsbmb.2011.08.007.
32. Kabir, E.R.; Rahman, M.S.; Rahman, I. A Review on Endocrine Disruptors and Their Possible Impacts on Human Health. *Environ Toxicol Pharmacol* 2015, *40*, 241–258, doi:10.1016/j.etap.2015.06.009.
33. Vandenberg, L.N.; Ehrlich, S.; Belcher, S.M.; Ben-Jonathan, N.; Dolinoy, D.C.; Hugo, E.R.; Hunt, P.A.; Newbold, R.R.; Rubin, B.S.; Saili, K.S.; et al. Low Dose Effects of Bisphenol A: An Integrated Review of in Vitro, Laboratory Animal, and Epidemiology Studies. *Endocr. Disruptors* 2013, *1*, e26490, doi:10.4161/endo.26490.
34. Mylchreest, E.; Sar, M.; Wallace, D.G.; Foster, P.M.D. Fetal Testosterone Insufficiency and Abnormal Proliferation of Leydig Cells and Gonocytes in Rats Exposed to Di(n-Butyl) Phthalate. *Reprod. Toxicol.* 2002, *16*, 19–28, doi:10.1016/S0890-6238(01)00201-5.
35. Parks, L.G.; Ostby, J.S.; Lambright, C.R.; Abbott, B.D.; Klinefelter, G.R.; Barlow, N.J.; Gray, L.E. The Plasticizer Diethylhexyl Phthalate Induces Malformations by Decreasing Fetal Testosterone Synthesis during Sexual Differentiation in the Male Rat. *Toxicol. Sci.* 2000, *58*, 339–349, doi:10.1093/toxsci/58.2.339.
36. La Merrill, M.A.; Vandenberg, L.N.; Smith, M.T.; Goodson, W.; Browne, P.; Patisaul, H.B.; Guyton, K.Z.; Kortenkamp, A.; Coglianò, V.J.; Woodruff, T.J.; et al. Consensus on the Key Characteristics of Endocrine-Disrupting Chemicals as a Basis for Hazard Identification. *Nat Rev Endocrinol* 2020, *16*, 45–57, doi:10.1038/s41574-019-0273-8.
37. Nazari, E.; Suja, F. Effects of 17 $\beta$ -Estradiol (E2) on Aqueous Organisms and Its Treatment Problem: A Review. *Rev Environ Health* 2016, *31*, 465–491, doi:10.1515/reveh-2016-0040.
38. Pironti, C.; Ricciardi, M.; Proto, A.; Bianco, P.M.; Montano, L.; Motta, O. Endocrine-Disrupting Compounds: An Overview on Their Occurrence in the Aquatic Environment and Human Exposure. *Water (Switzerland)* 2021, *13*, 1347, doi:10.3390/w13101347.

39. Virtuoso, S.; Raggi, C.; Maugliani, A.; Baldi, F.; Gentili, D.; Narciso, L. Toxicological Effects of Naturally Occurring Endocrine Disruptors on Various Human Health Targets: A Rapid Review. *Toxics* 2024, 12, 256, doi:10.3390/toxics12040256.
40. Diamanti-Kandarakis, E.; Bourguignon, J.P.; Giudice, L.C.; Hauser, R.; Prins, G.S.; Soto, A.M.; Zoeller, R.T.; Gore, A.C. Endocrine-Disrupting Chemicals: An Endocrine Society Scientific Statement. *Endocr Rev* 2009, 30, 293–342, doi:10.1210/er.2009-0002.
41. Demeneix, B.; Slama, R.; Research Center Endocrine Disruptors: From Scientific Evidence to Human Health Protection. *Study Requested by the PETI committee, European Parliament* 2019.
42. Casals-Casas, C.; Desvergne, B. Endocrine Disruptors: From Endocrine to Metabolic Disruption. *Annu Rev Physiol* 2011, 73, doi:10.1146/annurev-physiol-012110-142200.
43. Goralczyk, K. A Review of the Impact of Selected Anthropogenic Chemicals from the Group of Endocrine Disruptors on Human Health. *Toxics* 2021, 9, 146, doi:10.3390/toxics9070146.
44. Autrup, H.; Barile, F.A.; Berry, S.C.; Blaauboer, B.J.; Boobis, A.; Bolt, H.; Borgert, C.J.; Dekant, W.; Dietrich, D.; Domingo, J.L.; et al. Human Exposure to Synthetic Endocrine Disrupting Chemicals (S-EDCs) Is Generally Negligible as Compared to Natural Compounds with Higher or Comparable Endocrine Activity: How to Evaluate the Risk of the S-EDCs? *Arch Toxicol* 2020, 94, 104861, doi:10.1007/s00204-020-02800-8.
45. Mnif, W.; Hassine, A.I.H.; Bouaziz, A.; Bartegi, A.; Thomas, O.; Roig, B. Effect of Endocrine Disruptor Pesticides: A Review. *Int J Environ Res Public Health* 2011, 8, 2265–2303, doi:10.3390/ijerph8062265.
46. Jawale CA; Rajput KH; Ugale BJ Assessing the Impact of Pesticides: An Overview. *Int. J. Life Sci.* 2017, 5, 474–479.
47. Mrema, E.J.; Rubino, F.M.; Brambilla, G.; Moretto, A.; Tsatsakis, A.M.; Colosio, C. Persistent Organochlorinated Pesticides and Mechanisms of Their Toxicity. *Toxicology* 2013, 307, 74–88, doi:10.1016/j.tox.2012.11.015.
48. Beard, J. DDT and Human Health. *Sci. Total Environ.* 2006, 355, 78–89, doi:10.1016/j.scitotenv.2005.02.022.
49. La Merrill, M.A.; Krigbaum, N.Y.; Cirillo, P.M.; Cohn, B.A. Association between Maternal Exposure to the Pesticide Dichlorodiphenyltrichloroethane (DDT)

- and Risk of Obesity in Middle Age. *Int J Obes* 2020, 44, 1723–1732, doi:10.1038/s41366-020-0586-7.
50. Cirillo, P.M.; La Merrill, M.A.; Krigbaum, N.Y.; Cohn, B.A. Grandmaternal Perinatal Serum DDT in Relation to Granddaughter Early Menarche and Adult Obesity: Three Generations in the Child Health and Development Studies Cohort. *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.* 2021, 30, 1480–1488, doi:10.1158/1055-9965.EPI-20-1456.
  51. Yipei, Y.; Zhilin, L.; Yuhong, L.; Meng, W.; Huijun, W.; Chang, S.; Yan, H. Assessing the Risk of Diabetes in Participants with DDT DDE Exposure- A Systematic Review and Meta-Analysis. *Environ Res* 2022, 210, 113018, doi:10.1016/j.envres.2022.113018.
  52. Criswell, R.; Lenters, V.; Mandal, S.; Stigum, H.; Iszatt, N.; Eggesbø, M. Persistent Environmental Toxicants in Breast Milk and Rapid Infant Growth. *Ann Nutr Metab* 2017, 70, 210–216, doi:10.1159/000463394.
  53. Srivastava, V.; Srivastava, T.; Kumar, M.S. Fate of the Persistent Organic Pollutant (POP)Hexachlorocyclohexane (HCH) and Remediation Challenges. *Int Biodeterior Biodegradation* 2019, 140, 43–56, doi:10.1016/j.ibiod.2019.03.004.
  54. Sidhu, G.K.; Singh, S.; Kumar, V.; Dhanjal, D.S.; Datta, S.; Singh, J. Toxicity, Monitoring and Biodegradation of Organophosphate Pesticides: A Review. *Crit Rev Environ Sci Technol* 2019, 49, 1135–1187, doi:10.1080/10643389.2019.1565554.
  55. Kumar, V.; Upadhyay, N.; Wasit, A.; Singh, S.; Kaur, P. Spectroscopic Methods for the Detection of Organophosphate Pesticides – A Preview. *Curr. World Environ.* 2013, 8, 313–318, doi:10.12944/cwe.8.2.19.
  56. Jaga, K.; Dharmani, C. Sources of Exposure to and Public Health Implications of Organophosphate Pesticides. *Rev Panam Salud Publica* 2003, 14, 171–185, doi:10.1590/S1020-49892003000800004.
  57. Agostini, L.P.; Dettogni, R.S.; dos Reis, R.S.; Stur, E.; dos Santos, E.V.W.; Vontorim, D.P.; Garcia, F.M.; Cardoso, R.C.; Graceli, J.B.; Louro, I.D. Effects of Glyphosate Exposure on Human Health: Insights from Epidemiological and in Vitro Studies. *Sci. Total Environ.* 2020, 705, 135808, doi:10.1016/j.scitotenv.2019.135808.
  58. Nandi, N.K.; Vyas, A.; Akhtar, M.J.; Kumar, B. The Growing Concern of Chlorpyrifos Exposures on Human and Environmental Health. *Pestic Biochem Physiol* 2022, 185, 105138, doi:10.1016/j.pestbp.2022.105138.

59. Wołejko, E.; Łozowicka, B.; Jabłońska-Trypuć, A.; Pietruszyńska, M.; Wydro, U. Chlorpyrifos Occurrence and Toxicological Risk Assessment: A Review. *Int. J. Environ. Res. Public Health* 2022, *19*, 12209, doi:10.3390/ijerph191912209.
60. Badr, A.M. Organophosphate Toxicity: Updates of Malathion Potential Toxic Effects in Mammals and Potential Treatments. *Environ. Sci. Pollut. Res.* 2020, *27*, 26036–26057, doi:10.1007/s11356-020-08937-4.
61. Soriano, J.M.; Jiménez, B.; Font, G.; Moltó, J.C. Analysis of Carbamate Pesticides and Their Metabolites in Water by Solid Phase Extraction and Liquid Chromatography: A Review. *Crit Rev Anal Chem* 2001, *31*, 19–52, doi:10.1080/20014091076677.
62. Mustapha, M.U.; Halimoon, N.; Johar, W.L.W.; Shukor, M.Y.A. An Overview on Biodegradation of Carbamate Pesticides by Soil Bacteria. *Pertanika J Sci Technol* 2019, *27*, 547–563.
63. Mdeni, N.L.; Adeniji, A.O.; Okoh, A.I.; Okoh, O.O. Analytical Evaluation of Carbamate and Organophosphate Pesticides in Human and Environmental Matrices: A Review. *Molecules* 2022, *27*, 618, doi:10.3390/molecules27030618.
64. Xia, Y.; Cheng, S.; Bian, Q.; Xu, L.; Collins, M.D.; Chang, H.C.; Song, L.; Liu, J.; Wang, S.; Wang, X. Genotoxic Effects on Spermatozoa of Carbaryl-Exposed Workers. *Toxicol. Sci.* 2005, *85*, 615–623, doi:10.1093/toxsci/kfi066.
65. Zhou, T.; Guo, T.; Wang, Y.; Wang, A.; Zhang, M. Carbendazim: Ecological Risks, Toxicities, Degradation Pathways and Potential Risks to Human Health. *Chemosphere* 2023, *314*, 137723, doi:10.1016/j.chemosphere.2022.137723.
66. Schechter, A.; Birnbaum, L.; Ryan, J.J.; Constable, J.D. Dioxins: An Overview. *Environ Res* 2006, *101*, 419–428, doi:10.1016/j.envres.2005.12.003.
67. Hites, R.A. Dioxins: An Overview and History. *Environ Sci Technol* 2011, *45*, 16–20, doi:10.1021/es1013664.
68. Kulkarni, P.S.; Crespo, J.G.; Afonso, C.A.M. Dioxins Sources and Current Remediation Technologies - A Review. *Environ Int* 2008, *34*, 139–153, doi:10.1016/j.envint.2007.07.009.
69. Pelclová, D.; Urban, P.; Preiss, J.; Lukáš, E.; Fenclová, Z.; Navrátil, T.; Dubská, Z.; Šenholdová, Z. Adverse Health Effects in Humans Exposed to 2,3,7,8-Tetrachlorodibenzo-p- Dioxin (TCDD). *Rev Environ Health* 2006, *21*, 119–138, doi:10.1515/REVEH.2006.21.2.119.

70. Ross, G. The Public Health Implications of Polychlorinated Biphenyls (PCBs) in the Environment. *Ecotoxicol Environ Saf* 2004, 59, 275–291, doi:10.1016/j.ecoenv.2004.06.003.
71. Erickson, M.D.; Kaley, R.G. Applications of Polychlorinated Biphenyls. *Environ. Sci. Pollut. Res.* 2011, 18, 135–151, doi:10.1007/s11356-010-0392-1.
72. Buha Djordjevic, A.; Antonijevic, E.; Curcic, M.; Milovanovic, V.; Antonijevic, B. Endocrine-Disrupting Mechanisms of Polychlorinated Biphenyls. *Curr Opin Toxicol* 2020, 19, 42–49, doi:10.1016/j.cotox.2019.10.006.
73. Gaillard, L.; Barouki, R.; Blanc, E.; Coumoul, X.; Andréau, K. Per-and Polyfluoroalkyl Substances as Persistent Pollutants with Metabolic and Endocrine-Disrupting Impacts. *Trends Endocrinol Metab* 2024, 36, 249–261, doi:10.1016/j.tem.2024.07.021.
74. Kar, S.; Sepúlveda, M.S.; Roy, K.; Leszczynski, J. Endocrine-Disrupting Activity of per- and Polyfluoroalkyl Substances: Exploring Combined Approaches of Ligand and Structure Based Modeling. *Chemosphere* 2017, 184, 514–523, doi:10.1016/j.chemosphere.2017.06.024.
75. Glüge, J.; Scheringer, M.; Cousins, I.T.; Dewitt, J.C.; Goldenman, G.; Herzke, D.; Lohmann, R.; Ng, C.A.; Trier, X.; Wang, Z. An Overview of the Uses of Per- And Polyfluoroalkyl Substances (PFAS). *Environ Sci Process Impacts* 2020, 22, 2345–2373, doi:10.1039/d0em00291g.
76. Mokra, K. Endocrine Disruptor Potential of Short-and Long-Chain Perfluoroalkyl Substances (Pfass)—a Synthesis of Current Knowledge with Proposal of Molecular Mechanism. *Int J Mol Sci* 2021, 22, 2148, doi:10.3390/ijms22042148.
77. Azhagiya Singam, E.R.; Tachachartvanich, P.; Fourches, D.; Soshilov, A.; Hsieh, J.C.Y.; La Merrill, M.A.; Smith, M.T.; Durkin, K.A. Structure-Based Virtual Screening of Perfluoroalkyl and Polyfluoroalkyl Substances (PFASs) as Endocrine Disruptors of Androgen Receptor Activity Using Molecular Docking and Machine Learning. *Environ Res* 2020, 190, 109920, doi:10.1016/j.envres.2020.109920.
78. Ojo, A.F.; Peng, C.; Ng, J.C. Assessing the Human Health Risks of Per- and Polyfluoroalkyl Substances: A Need for Greater Focus on Their Interactions as Mixtures. *J Hazard Mater* 2021, 407, 124863, doi:10.1016/j.jhazmat.2020.124863.
79. Vos, J.G.; Becher, G.; Van Den Berg, M.; De Boer, J.; Leonards, P.E.G. Brominated Flame Retardants and Endocrine Disruption. *Pure Appl. Chem.* 2003, 75, 2039–2046, doi:10.1351/pac200375112039.

80. Darnerud, P.O. Brominated Flame Retardants as Possible Endocrine Disrupters. *Int. J. Androl.* 2008, 31, 152–160, doi:10.1111/j.1365-2605.2008.00869.x.
81. Fromme, H.; Becher, G.; Hilger, B.; Völkel, W. Brominated Flame Retardants - Exposure and Risk Assessment for the General Population. *Int J Hyg Environ Health* 2016, 219, 1–23, doi:10.1016/j.ijheh.2015.08.004.
82. Zhou, H.; Yin, N.; Faiola, F. Tetrabromobisphenol A (TBBPA): A Controversial Environmental Pollutant. *J Environ Sci (China)* 2020, 97, 54–66, doi:10.1016/j.jes.2020.04.039.
83. Harris, S.J.; Cecil, H.C.; Bitman, J. Embryotoxic Effects of Polybrominated Biphenyls (PBB) in Rats. *Environ Health Perspect* 1978, 23, 295–300, doi:10.1289/ehp.7823295.
84. Ying, G.G.; Williams, B.; Kookana, R. Environmental Fate of Alkylphenols and Alkylphenol Ethoxylates - A Review. *Environ Int* 2002, 28, 215–226, doi:10.1016/S0160-4120(02)00017-X.
85. Zoller, U. Estuarine and Coastal Zone Marine Pollution by the Nonionic Alkylphenol Ethoxylates Endocrine Disrupters: Is There a Potential Ecotoxicological Problem? *Environ. Int.* 2006, 32, 269–272, doi:10.1016/j.envint.2005.08.023.
86. Omar, T.F.T.; Ahmad, A.; Aris, A.Z.; Yusoff, F.M. Endocrine Disrupting Compounds (EDCs) in Environmental Matrices: Review of Analytical Strategies for Pharmaceuticals, Estrogenic Hormones, and Alkylphenol Compounds. *Trends Anal. Chem.* 2016, 85, 241–259, doi:10.1016/j.trac.2016.08.004.
87. Zhu, Z.; Zuo, Y. Bisphenol A and Other Alkylphenols in the Environment - Occurrence, Fate, Health Effects and Analytical Techniques. *Adv. Environ. Res.* 2013, 2, 179–202, doi:10.12989/aer.2013.2.3.179.
88. Soares, A.; Guieysse, B.; Jefferson, B.; Cartmell, E.; Lester, J.N. Nonylphenol in the Environment: A Critical Review on Occurrence, Fate, Toxicity and Treatment in Wastewaters. *Environ Int* 2008, 34, 1033–1049, doi:10.1016/j.envint.2008.01.004.
89. Lin, C.Y.; Lee, H.L.; Chen, C.W.; Sung, F.C.; Su, T.C. Association between Serum Levels of 4-Tertiary-Octylphenol and Thyroid Function in a Young Cohort Study. *J. Hazard. Mater. Adv.* 2024, 16, 100476, doi:10.1016/j.hazadv.2024.100476.
90. Bolujoko, N.B.; Unuabonah, E.I.; Alfred, M.O.; Ogunlaja, A.; Ogunlaja, O.O.; Omorogie, M.O.; Olukanni, O.D. Toxicity and Removal of Parabens from Water:

- A Critical Review. *Sci Total Environ* 2021, 792, 148092, doi:10.1016/j.scitotenv.2021.148092.
91. Hager, E.; Chen, J.; Zhao, L. Minireview: Parabens Exposure and Breast Cancer. *Int J Environ Res Public Health* 2022, 19, 1873, doi:10.3390/ijerph19031873.
  92. Nowak, K.; Ratajczak-Wrona, W.; Górski, M.; Jabłońska, E. Parabens and Their Effects on the Endocrine System. *Mol Cell Endocrinol* 2018, 474, 238–251, doi:10.1016/j.mce.2018.03.014.
  93. Byford, J.R.; Shaw, L.E.; Drew, M.G.B.; Pope, G.S.; Sauer, M.J.; Darbre, P.D. Oestrogenic Activity of Parabens in MCF7 Human Breast Cancer Cells. *Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology* 2002, 80, doi:10.1016/S0960-0760(01)00174-1.
  94. Koeppe, E.S.; Ferguson, K.K.; Colacino, J.A.; Meeker, J.D. Relationship between Urinary Triclosan and Paraben Concentrations and Serum Thyroid Measures in NHANES 2007-2008. *Science of the Total Environment* 2013, 445–446, doi:10.1016/j.scitotenv.2012.12.052.
  95. Aker, A.M.; Watkins, D.J.; Johns, L.E.; Ferguson, K.K.; Soldin, O.P.; Anzalota Del Toro, L. V.; Alshawabkeh, A.N.; Cordero, J.F.; Meeker, J.D. Phenols and Parabens in Relation to Reproductive and Thyroid Hormones in Pregnant Women. *Environ Res* 2016, 151, 30–37, doi:10.1016/j.envres.2016.07.002.
  96. Guerra, M.T.; Sanabria, M.; Leite, G.A.A.; Borges, C.S.; Cuciolo, M.S.; Anselmo-Franci, J.A.; Foster, W.G.; Kempinas, W.G. Maternal Exposure to Butyl Paraben Impairs Testicular Structure and Sperm Quality on Male Rats. *Environ Toxicol* 2017, 32, 1273–1289, doi:10.1002/tox.22323.
  97. Carstensen, L.; Beil, S.; Börnick, H.; Stolte, S. Structure-Related Endocrine-Disrupting Potential of Environmental Transformation Products of Benzophenone-Type UV Filters: A Review. *J Hazard Mater* 2022, 430, 128495, doi:10.1016/j.jhazmat.2022.128495.
  98. Wu, M. hong; Li, J.; Xu, G.; Ma, L. dan; Li, J. jun; Li, J. song; Tang, L. Pollution Patterns and Underlying Relationships of Benzophenone-Type UV-Filters in Wastewater Treatment Plants and Their Receiving Surface Water. *Ecotoxicol Environ Saf* 2018, 152, doi:10.1016/j.ecoenv.2018.01.036.
  99. Liao, C.; Kannan, K. Widespread Occurrence of Benzophenone-Type Uv Light Filters in Personal Care Products from China and the United States: An Assessment of Human Exposure. *Environ Sci Technol* 2014, 48, 4103–4109, doi:10.1021/es405450n.

100. Ma, J.; Wang, Z.; Qin, C.; Wang, T.; Hu, X.; Ling, W. Safety of Benzophenone-Type UV Filters: A Mini Review Focusing on Carcinogenicity, Reproductive and Developmental Toxicity. *Chemosphere* 2023, 326, 138455, doi:10.1016/j.chemosphere.2023.138455.
101. Mao, J.F.; Li, W.; Ong, C.N.; He, Y.; Jong, M.C.; Gin, K.Y.H. Assessment of Human Exposure to Benzophenone-Type UV Filters: A Review. *Environ Int* 2022, 167, 107405, doi:10.1016/j.envint.2022.107405.
102. Li, Y.; Zhu, J.; Fan, J.; Cai, S.; Fan, C.; Zhong, Y.; Sun, L. Associations of Urinary Levels of Phenols and Parabens with Osteoarthritis among US Adults in NHANES 2005–2014. *Ecotoxicol Environ Saf* 2020, 192, doi:10.1016/j.ecoenv.2020.110293.
103. Kunisue, T.; Chen, Z.; Buck Louis, G.M.; Sundaram, R.; Hediger, M.L.; Sun, L.; Kannan, K. Urinary Concentrations of Benzophenone-Type UV Filters in U.S. Women and Their Association with Endometriosis. *Environ Sci Technol* 2012, 46, doi:10.1021/es204415a.
104. Blüthgen, N.; Zucchi, S.; Fent, K. Effects of the UV Filter Benzophenone-3 (Oxybenzone) at Low Concentrations in Zebrafish (*Danio Rerio*). *Toxicol Appl Pharmacol* 2012, 263, 184–194, doi:10.1016/j.taap.2012.06.008.
105. Wolff, M.S.; Engel, S.M.; Berkowitz, G.S.; Ye, X.; Silva, M.J.; Zhu, C.; Wetmur, J.; Calafat, A.M. Prenatal Phenol and Phthalate Exposures and Birth Outcomes. *Environ Health Perspect* 2008, 116, 1092–1097, doi:10.1289/ehp.11007.
106. Weisbrod, C.J.; Kunz, P.Y.; Zenker, A.K.; Fent, K. Effects of the UV Filter Benzophenone-2 on Reproduction in Fish. *Toxicol Appl Pharmacol* 2007, 225, 255–266, doi:10.1016/j.taap.2007.08.004.
107. Darbre, P.D. Chemical Components of Plastics as Endocrine Disruptors: Overview and Commentary. *Birth Defects Res* 2020, 112, 1300–1307, doi:10.1002/bdr2.1778.
108. Geens, T.; Goeyens, L.; Covaci, A. Are Potential Sources for Human Exposure to Bisphenol-A Overlooked? *Int J Hyg Environ Health* 2011, 214, 339–347, doi:10.1016/j.ijheh.2011.04.005.
109. Ohore, O.E.; Songhe, Z. Endocrine Disrupting Effects of Bisphenol A Exposure and Recent Advances on Its Removal by Water Treatment Systems. A Review. *Sci Afr* 2019, 5, e00135, doi:10.1016/j.sciaf.2019.e00135.
110. Navarro-Ortega, A.; Barceló, D. Persistent Organic Pollutants in Water, Sediments, and Biota in the Ebro River Basin. In; 2010.

111. Belfroid, A.; Van Velzen, M.; Van der Horst, B.; Vethaak, D. Occurrence of Bisphenol A in Surface Water and Uptake in Fish: Evaluation of Field Measurements. *Chemosphere* 2002, 49, 97–103, doi:10.1016/S0045-6535(02)00157-1.
112. Arditsoglou, A.; Voutsas, D. Partitioning of Endocrine Disrupting Compounds in Inland Waters and Wastewaters Discharged into the Coastal Area of Thessaloniki, Northern Greece. *Environ. Sci. Pollut. Res.* 2010, 17, 529–538, doi:10.1007/s11356-009-0172-y.
113. Hines, C.J.; Jackson, M. V.; Christianson, A.L.; Clark, J.C.; Arnold, J.E.; Pretty, J.R.; Deddens, J.A. Air, Hand Wipe, and Surface Wipe Sampling for Bisphenol A (BPA) among Workers in Industries That Manufacture and Use BPA in the United States. *J Occup Environ Hyg* 2017, 14, 882–897, doi:10.1080/15459624.2017.1339164.
114. Toner, F.; Allan, G.; Dimond, S.S.; Waechter, J.M.; Beyer, D. In Vitro Percutaneous Absorption and Metabolism of Bisphenol A (BPA) through Fresh Human Skin. *Toxicol In Vitro* 2018, 47, 147–155, doi:10.1016/j.tiv.2017.11.002.
115. Chen, W.Y.; Shen, Y.P.; Chen, S.C. Assessing Bisphenol A (BPA) Exposure Risk from Long-Term Dietary Intakes in Taiwan. *Sci Total Environ* 2016, 543, 140–146, doi:10.1016/j.scitotenv.2015.11.029.
116. Cao, X.L.; Corriveau, J.; Popovic, S. Migration of Bisphenol A from Can Coatings to Liquid Infant Formula during Storage at Room Temperature. *J Food Prot* 2009, 72, 2571–2574, doi:10.4315/0362-028X-72.12.2571.
117. Carwile, J.L.; Luu, H.T.; Bassett, L.S.; Driscoll, D.A.; Yuan, C.; Chang, J.Y.; Ye, X.; Calafat, A.M.; Michels, K.B. Polycarbonate Bottle Use and Urinary Bisphenol A Concentrations. *Environ Health Perspect* 2009, 117, 1368–1372, doi:10.1289/ehp.0900604.
118. Tsai, W.T. Human Health Risk on Environmental Exposure to Bisphenol-A: A Review. *J Environ Sci Health C Environ Carcinog Ecotoxicol Rev* 2006, 24, 225–255, doi:10.1080/10590500600936482.
119. Hao, M.; Ding, L.; Xuan, L.; Wang, T.; Li, M.; Zhao, Z.; Lu, J.; Xu, Y.; Chen, Y.; Wang, W.; et al. Urinary Bisphenol A Concentration and the Risk of Central Obesity in Chinese Adults: A Prospective Study. *J Diabetes* 2018, 10, 442–448, doi:10.1111/1753-0407.12531.
120. Lee, I.; Kim, S.; Kim, K.T.; Kim, S.; Park, S.; Lee, H.; Jeong, Y.; Lim, J.E.; Moon, H.B.; Choi, K. Bisphenol A Exposure through Receipt Handling and Its Association with Insulin Resistance among Female Cashiers. *Environ Int* 2018, 117, 268–275, doi:10.1016/j.envint.2018.05.013.

121. Chen, X.; Xu, S.; Tan, T.; Lee, S.T.; Cheng, S.H.; Lee, F.W.F.; Xu, S.J.L.; Ho, K.C. Toxicity and Estrogenic Endocrine Disrupting Activity of Phthalates and Their Mixtures. *Int J Environ Res Public Health* 2014, *11*, 3156–3168, doi:10.3390/ijerph110303156.
122. Domínguez-Morueco, N.; González-Alonso, S.; Valcárcel, Y. Phthalate Occurrence in Rivers and Tap Water from Central Spain. *Sci Total Environ* 2014, *500–501*, 139–146, doi:10.1016/j.scitotenv.2014.08.098.
123. Bergh, C.; Torgrip, R.; Emenius, G.; Östman, C. Organophosphate and Phthalate Esters in Air and Settled Dust - a Multi-Location Indoor Study. *Indoor Air* 2011, *21*, 67–76, doi:10.1111/j.1600-0668.2010.00684.x.
124. Xia, X.; Yang, L.; Bu, Q.; Liu, R. Levels, Distribution, and Health Risk of Phthalate Esters in Urban Soils of Beijing, China. *J Environ Qual* 2011, *40*, 1643–1651, doi:10.2134/jeq2011.0032.
125. Gao, D.W.; Wen, Z.D. Phthalate Esters in the Environment: A Critical Review of Their Occurrence, Biodegradation, and Removal during Wastewater Treatment Processes. *Sci Total Environ* 2016, *541*, 986–1001, doi:10.1016/j.scitotenv.2015.09.148.
126. Chang, W.H.; Herianto, S.; Lee, C.C.; Hung, H.; Chen, H.L. The Effects of Phthalate Ester Exposure on Human Health: A Review. *Sci Total Environ* 2021, *786*, 147371, doi:10.1016/j.scitotenv.2021.147371.
127. Sun, Q.; Cornelis, M.C.; Townsend, M.K.; Tobias, D.K.; Heather Eliassen, A.; Franke, A.A.; Hauser, R.; Hu, F.B. Association of Urinary Concentrations of Bisphenol A and Phthalate Metabolites with Risk of Type 2 Diabetes: A Prospective Investigation in the Nurses' Health Study (NHS) and NHSII Cohorts. *Environ Health Perspect* 2014, *122*, 616–623, doi:10.1289/ehp.1307201.
128. Gupta, P.K. Toxicity of Fungicides. In *Veterinary Toxicology: Basic and Clinical Principles: Third Edition*; Academic Press, 2018; pp. 569–580.
129. Draskau, M.K.; Svingen, T. Azole Fungicides and Their Endocrine Disrupting Properties: Perspectives on Sex Hormone-Dependent Reproductive Development. *Front. Toxicol.* 2022, *4*, 883254, doi:10.3389/ftox.2022.883254.
130. Jabłońska-Trypuć, A.; Wydro, U.; Wotejko, E.; Makuła, M.; Krętowski, R.; Naumowicz, M.; Sokołowska, G.; Serra-Majem, L.; Cechowska-Pasko, M.; Łozowicka, B.; et al. Selected Fungicides as Potential EDC Estrogenic Micropollutants in the Environment. *Molecules* 2023, *28*, 7437, doi:10.3390/molecules28217437.

131. Munkboel, C.H.; Rasmussen, T.B.; Elgaard, C.; Olesen, M.L.K.; Kretschmann, A.C.; Styrisshave, B. The Classic Azole Antifungal Drugs Are Highly Potent Endocrine Disruptors in Vitro Inhibiting Steroidogenic CYP Enzymes at Concentrations Lower than Therapeutic Cmax. *Toxicology* 2019, 425, 152247, doi:10.1016/j.tox.2019.152247.
132. Pacholak, A.; Burlaga, N.; Frankowski, R.; Zgota-Grzeškowiak, A.; Kaczorek, E. Azole Fungicides: (Bio)Degradation, Transformation Products and Toxicity Elucidation. *Sci Total Environ* 2022, 802, 149917, doi:10.1016/j.scitotenv.2021.149917.
133. Draskau, M.K.; Boberg, J.; Taxvig, C.; Pedersen, M.; Frandsen, H.L.; Christiansen, S.; Svingen, T. In Vitro and in Vivo Endocrine Disrupting Effects of the Azole Fungicides Triticonazole and Flusilazole. *Environ. Pollut.* 2019, 255, 113309, doi:10.1016/j.envpol.2019.113309.
134. Hoch, M. Organotin Compounds in the Environment - An Overview. *Appl. Geochem.* 2001, 16, 719–743, doi:10.1016/S0883-2927(00)00067-6.
135. Appel, K.E. Organotin Compounds: Toxicokinetic Aspects. *Drug Metab Rev* 2004, 36, 763–786, doi:10.1081/DMR-200033490.
136. Craig, P.J.; Jenkins, R.O. Organometallic Compounds in the Environment: An Overview. In *Organic Metal and Metalloid Species in the Environment*; Springer, 2004; pp. 1–15.
137. Zuo, Z.; Chen, S.; Wu, T.; Zhang, J.; Su, Y.; Chen, Y.; Wang, C. Tributyltin Causes Obesity and Hepatic Steatosis in Male Mice. *Environ Toxicol* 2011, 26, 79–85, doi:10.1002/tox.20531.
138. S, J.P.; Evan Prince, S. Diclofenac-Induced Renal Toxicity in Female Wistar Albino Rats Is Protected by the Pre-Treatment of Aqueous Leaves Extract of Madhuca Longifolia through Suppression of Inflammation, Oxidative Stress and Cytokine Formation. *Biomed Pharmacother* 2018, 98, 45–51, doi:10.1016/j.biopha.2017.12.028.
139. Saravanan, M.; Ramesh, M. Short and Long-Term Effects of Clofibric Acid and Diclofenac on Certain Biochemical and Ionoregulatory Responses in an Indian Major Carp, Cirrhinus Mrigala. *Chemosphere* 2013, 93, 388–396, doi:10.1016/j.chemosphere.2013.05.015.
140. Mohd Zanuri, N.B.; Bentley, M.G.; Caldwell, G.S. Assessing the Impact of Diclofenac, Ibuprofen and Sildenafil Citrate (Viagra®) on the Fertilisation Biology of Broadcast Spawning Marine Invertebrates. *Mar Environ Res* 2017, 127, 126–136, doi:10.1016/j.marenvres.2017.04.005.

141. Alrashood, S.T. Chapter Three - Carbamazepine. In *Profiles of Drug Substances, Excipients and Related Methodology*; Academic Press, 2016; Vol. 41, pp. 133–321.
142. Schapira, M.; Manor, O.; Golan, N.; Kalo, D.; Mordehay, V.; Kirshenbaum, N.; Goldsmith, R.; Chefetz, B.; Paltiel, O. Involuntary Human Exposure to Carbamazepine: A Cross-Sectional Study of Correlates across the Lifespan and Dietary Spectrum. *Environ Int* 2020, 143, 105951, doi:10.1016/j.envint.2020.105951.
143. Oropesa, A.L.; Floro, A.M.; Palma, P. Assessment of the Effects of the Carbamazepine on the Endogenous Endocrine System of *Daphnia Magna*. *Environ. Sci. Pollut. Res.* 2016, 23, 17311–17321, doi:10.1007/s11356-016-6907-7.
144. Yoo, J.W.; Lee, C.H. Drug Delivery Systems for Hormone Therapy. *J. Control Release* 2006, 112, 1–14, doi:10.1016/j.jconrel.2006.01.021.
145. Wojnarowski, K.; Podobiński, P.; Cholewińska, P.; Smoliński, J.; Dorobisz, K. Impact of Estrogens Present in Environment on Health and Welfare of Animals. *Animals* 2021, 11, 2152, doi:10.3390/ani11072152.
146. Barboza, L.S.; Sánchez, P.S.V.; Gil, S.A.A. Removal of Estrone in Water and Wastewater by Photocatalysis: A Systematic Review. *Prod Limpia* 2019, 14, 18–32, doi:10.22507/pml.v14n1a7.
147. Wu, C.C.; Shields, J.N.; Akemann, C.; Meyer, D.N.; Connell, M.; Baker, B.B.; Pitts, D.K.; Baker, T.R. The Phenotypic and Transcriptomic Effects of Developmental Exposure to Nanomolar Levels of Estrone and Bisphenol A in Zebrafish. *Science of the Total Environment* 2021, 757, doi:10.1016/j.scitotenv.2020.143736.
148. Metcalfe, C.D.; Bayen, S.; Desrosiers, M.; Muñoz, G.; Sauvé, S.; Yargeau, V. An Introduction to the Sources, Fate, Occurrence and Effects of Endocrine Disrupting Chemicals Released into the Environment. *Environ Res* 2022, 207, 112658, doi:10.1016/j.envres.2021.112658.
149. Ismanto, A.; Hadibarata, T.; Kristanti, R.A.; Maslukah, L.; Safinatunnajah, N.; Sathishkumar, P. The Abundance of Endocrine-Disrupting Chemicals (EDCs) in Downstream of the Bengawan Solo and Brantas Rivers Located in Indonesia. *Chemosphere* 2022, 297, 134151, doi:10.1016/j.chemosphere.2022.134151.
150. Wu, C.; Huang, X.; Lin, J.; Liu, J. Occurrence and Fate of Selected Endocrine-Disrupting Chemicals in Water and Sediment from an Urban Lake. *Arch Environ Contam Toxicol* 2015, 68, 225–236, doi:10.1007/s00244-014-0087-6.

151. Ashfaq, M.; Li, Y.; Zubair, M.; Ur Rehman, M.S.; Sumrra, S.H.; Nazar, M.F.; Mustafa, G.; Fazal, M.T.; Ashraf, H.; Sun, Q. Occurrence and Risk Evaluation of Endocrine-Disrupting Chemicals in Wastewater and Surface Water of Lahore, Pakistan. *Environ Geochem Health* 2023, 45, 4837–4851, doi:10.1007/s10653-023-01527-6.
152. López-Velázquez, K.; Guzmán-Mar, J.L.; Saldarriaga-Noreña, H.A.; Murillo-Tovar, M.A.; Hinojosa-Reyes, L.; Villanueva-Rodríguez, M. Occurrence and Seasonal Distribution of Five Selected Endocrine-Disrupting Compounds in Wastewater Treatment Plants of the Metropolitan Area of Monterrey, Mexico: The Role of Water Quality Parameters. *Environ. Pollut.* 2021, 269, 116223, doi:10.1016/j.envpol.2020.116223.
153. Zhang, Z.F.; Wang, L.; Zhang, X.; Zhang, X.; Li, Y.F.; Nikolaev, A.; Li, W.L. Fate Processes of Parabens, Triclocarban and Triclosan during Wastewater Treatment: Assessment via Field Measurements and Model Simulations. *Environ. Sci. Pollut. Res.* 2021, 28, 50602–50610, doi:10.1007/s11356-021-14141-9.
154. Chiriac, F.L.; Paun, I.; Pirvu, F.; Iancu, V.; Galaon, T. Distribution, Removal Efficiencies and Environmental Risk Assessment of Benzophenone and Salicylate UV Filters in WWTPs and Surface Waters from Romania. *New J. Chem.* 2021, 45, 2478–2487, doi:10.1039/d0nj05214k.
155. Durcik, M.; Grobin, A.; Roškar, R.; Trontelj, J.; Peterlin Mašič, L. Estrogenic Potency of Endocrine Disrupting Chemicals and Their Mixtures Detected in Environmental Waters and Wastewaters. *Chemosphere* 2023, 330, 138712, doi:10.1016/j.chemosphere.2023.138712.
156. Xiao, Y.; Han, D.; Currell, M.; Song, X.; Zhang, Y. Review of Endocrine Disrupting Compounds (EDCs) in China's Water Environments: Implications for Environmental Fate, Transport and Health Risks. *Water Res* 2023, 245, 120645, doi:10.1016/j.watres.2023.120645.
157. Daverey, A.; Dutta, K.; Sarkar, A. An Overview of Analytical Methodologies for Environmental Monitoring. In *Tools, Techniques and Protocols for Monitoring Environmental Contaminants*; Elsevier, 2019; pp. 3–17.
158. Mota, M.F.S.; Waktola, H.D.; Nolvachai, Y.; Marriott, P.J. Gas Chromatography – Mass Spectrometry for Characterisation, Assessment of Quality and Authentication of Seed and Vegetable Oils. *Trends Anal. Chem.* 2021, 138, 116238, doi:10.1016/j.trac.2021.116238.

159. Laajimi, H.; Galli, F.; Patience, G.S.; Schieppati, D. Experimental Methods in Chemical Engineering: Gas Chromatography—GC. *Can. J. Chem. Eng.* 2022, *100*, 3123–3144, doi:10.1002/cjce.24395.
160. Fialkov, A.B.; Steiner, U.; Lehotay, S.J.; Amirav, A. Sensitivity and Noise in GC-MS: Achieving Low Limits of Detection for Difficult Analytes. *Int J Mass Spectrom* 2007, *260*, 31–48, doi:10.1016/j.ijms.2006.07.002.
161. Aznar, R.; Albero, B.; Sánchez-Brunete, C.; Miguel, E.; Martín-Girela, I.; Tadeo, J.L. Simultaneous Determination of Multiclass Emerging Contaminants in Aquatic Plants by Ultrasound-Assisted Matrix Solid-Phase Dispersion and GC-MS. *Environ. Sci. Pollut. Res.* 2017, *24*, 7911–7920, doi:10.1007/s11356-016-6327-8.
162. Sadiq, N.W.; Beauchemin, D. Liquid Chromatography. In *Sample Introduction Systems in ICPMS and ICPOES*; Elsevier, 2020; pp. 213–254.
163. Vera, J.; Fernandes, V.C.; Correia-Sá, L.; Mansilha, C.; Delerue-Matos, C.; Domingues, V.F. Occurrence of Selected Known or Suspected Endocrine-Disrupting Pesticides in Portuguese Surface Waters Using Spme-Gc-It/Ms. *Separations* 2021, *8*, 81, doi:10.3390/separations8060081.
164. Martínez, C.; Ramírez, N.; Gómez, V.; Pocurull, E.; Borrull, F. Simultaneous Determination of 76 Micropollutants in Water Samples by Headspace Solid Phase Microextraction and Gas Chromatography-Mass Spectrometry. *Talanta* 2013, *116*, 937–945, doi:10.1016/j.talanta.2013.07.055.
165. Melo, S.M.; Brito, N.M. Analysis and Occurrence of Endocrine Disruptors in Brazilian Water by HPLC-Fluorescence Detection. *Water Air Soil Pollut* 2014, *225*, 1–7, doi:10.1007/s11270-013-1783-y.
166. Goeury, K.; Vo Duy, S.; Munoz, G.; Prévost, M.; Sauvé, S. Assessment of Automated Off-Line Solid-Phase Extraction LC-MS/MS to Monitor EPA Priority Endocrine Disruptors in Tap Water, Surface Water, and Wastewater. *Talanta* 2022, *241*, 123216, doi:10.1016/j.talanta.2022.123216.
167. Ribeiro, C.; Tiritan, M.E.; Rocha, E.; Rocha, M.J. Development and Validation of a HPLC-DAD Method for Determination of Several Endocrine Disrupting Compounds in Estuarine Water. *J Liq Chromatogr Relat Technol* 2007, *30*, 2729–2746, doi:10.1080/10826070701560652.
168. Hejji, L.; Azzouz, A.; Colón, L.P.; Souhail, B.; Ballesteros, E. A Multi-Residue Method for Determining Twenty-Four Endocrine Disrupting Chemicals in Vegetables and Fruits Using Ultrasound-Assisted Solid-Liquid Extraction and Continuous Solid-Phase Extraction. *Chemosphere* 2021, *263*, 128158, doi:10.1016/j.chemosphere.2020.128158.

169. Poole, C.F. Core Concepts and Milestones in the Development of Solid-Phase Extraction. In *Solid-Phase Extraction*; Elsevier, 2020; pp. 1–36.
170. Poole, C.F. New Trends in Solid-Phase Extraction. *Trends Anal. Chem.* 2003, 22, 362–373, doi:10.1016/S0165-9936(03)00605-8.
171. Ozbek, N.; Baysal, A.; Akman, S.; Dogan, M. Solid-Phase Extraction. In *Analytical Separation Science*; 2015; pp. 1571–1594.
172. Müller, A.L.H.; De Oliveira, J.A.; Prestes, O.D.; Adaime, M.B.; Zanella, R. Design of Experiments and Method Development. In *Solid-Phase Extraction*; Elsevier, 2019; pp. 589–608.
173. Liu, S.; Huang, X.; Hu, K.; Jin, Q.; Zhu, G. Development of a Multiresidue Method for Endocrine-Disrupting Pesticides by Solid Phase Extraction and Determination by UHPLC-MS/MS from Drinking Water Samples. *J Chromatogr Sci* 2020, 58, 195–202, doi:10.1093/chromsci/bmz089.
174. Vidal, C.B.; Barbosa, P.G.A.; Pessoa, G.P.; Buarque, P.C.; Nascimento, J.G.S.; Filho, A.L.F.; Paz, M.S.; Dos Santos, A.B.; Cavalcante, R.M.; Nascimento, R.F. Multiresidue Determination of Endocrine Disrupting Compounds in Sewage Treatment Plants (SPE-HPLC-DAD). *J Braz Chem Soc* 2020, 31, 2518–2530, doi:10.21577/0103-5053.20200127.
175. Grobin, A.; Roškar, R.; Trontelj, J. A Robust Multi-Residue Method for the Monitoring of 25 Endocrine Disruptors at Ultra-Trace Levels in Surface Waters by SPE-LC-MS/MS. *Anal. Methods* 2023, 15, 2606–2621, doi:10.1039/d3ay00602f.
176. Tran, N.H.; Hu, J.; Ong, S.L. Simultaneous Determination of PPCPs, EDCs, and Artificial Sweeteners in Environmental Water Samples Using a Single-Step SPE Coupled with HPLC-MS/MS and Isotope Dilution. *Talanta* 2013, 113, 82–92, doi:10.1016/j.talanta.2013.03.072.
177. Kassotis, C.D.; Vandenberg, L.N.; Demeneix, B.A.; Porta, M.; Slama, R.; Trasande, L. Endocrine-Disrupting Chemicals: Economic, Regulatory, and Policy Implications. *Lancet Diabetes Endocrinol* 2020, 8, 719–730, doi:10.1016/S2213-8587(20)30128-5.
178. Hecker, M.; Hollert, H. Endocrine Disruptor Screening: Regulatory Perspectives and Needs. *Environ Sci Eur* 2011, 23, 1–14, doi:10.1186/2190-4715-23-15.
179. REACH Regulation - European Commission Available online: [https://environment.ec.europa.eu/topics/chemicals/reach-regulation\\_en](https://environment.ec.europa.eu/topics/chemicals/reach-regulation_en) (accessed on 31 January 2025).

180. Regulation - 1107/2009 - EN - EUR-Lex Available online: <https://eur-lex.europa.eu/eli/reg/2009/1107/oj/eng> (accessed on 31 January 2025).
181. Regulation - 528/2012 - EN - EUR-Lex Available online: <https://eur-lex.europa.eu/eli/reg/2012/528/oj/eng> (accessed on 31 January 2025).
182. EUR-Lex - 02009R1223-20240424 - EN - EUR-Lex Available online: <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/EN/TXT/?uri=CELEX%3A02009R1223-20240424> (accessed on 31 January 2025).
183. Endocrine Disruptor Screening Program (EDSP) | US EPA Available online: <https://www.epa.gov/endocrine-disruption> (accessed on 1 February 2025).
184. What We Do | FDA Available online: <https://www.fda.gov/about-fda/what-we-do> (accessed on 1 February 2025).
185. Brazilian Health Regulatory Agency (Anvisa) — Agência Nacional de Vigilância Sanitária - Anvisa Available online: <https://www.gov.br/anvisa/pt-br/english> (accessed on 1 February 2025).
186. BOE-A-2004-11653 Instrumento De Ratificación Del Convenio de Estocolmo Sobre Contaminantes Orgánicos Persistentes, Hecho En Estocolmo El 22 de Mayo de 2001. Available online: <https://www.boe.es/buscar/doc.php?id=BOE-A-2004-11653> (accessed on 1 February 2025).
187. Bergman, Å.; Heindel, J.; Jobling, S.; Kidd, K.; Zoeller, R.T. State-of-the-Science of Endocrine Disrupting Chemicals, 2012. *Toxicol Lett* 2012, 211, doi:10.1016/j.toxlet.2012.03.020.
188. Azizi, D.; Arif, A.; Blair, D.; Dionne, J.; Fillion, Y.; Ouarda, Y.; Pazmino, A.G.; Pulicharla, R.; Rilstone, V.; Tiwari, B.; et al. A Comprehensive Review on Current Technologies for Removal of Endocrine Disrupting Chemicals from Wastewaters. *Environ Res* 2022, 207, 112196, doi:10.1016/j.envres.2021.112196.
189. Zamri, M.F.M.A.; Bahru, R.; Suja', F.; Shamsuddin, A.H.; Pramanik, S.K.; Fattah, I.M.R. Treatment Strategies for Enhancing the Removal of Endocrine-Disrupting Chemicals in Water and Wastewater Systems. *J. Water Process Eng.* 2021, 41, 102017, doi:10.1016/j.jwpe.2021.102017.
190. Asakura, H.; Matsuto, T. Experimental Study of Behavior of Endocrine-Disrupting Chemicals in Leachate Treatment Process and Evaluation of Removal Efficiency. *Waste Manag.* 2009, 29, 1852–1859, doi:10.1016/j.wasman.2008.11.030.

191. Rathi, B.S.; Kumar, P.S.; Show, P.L. A Review on Effective Removal of Emerging Contaminants from Aquatic Systems: Current Trends and Scope for Further Research. *J Hazard Mater* 2021, 409, 124413, doi:10.1016/j.jhazmat.2020.124413.
192. Ndagijimana, P.; Liu, X.; Li, Z.; Yu, G.; Wang, Y. Optimized Synthesis of a Core-Shell Structure Activated Carbon and Its Adsorption Performance for Bisphenol A. *Sci. Total Environ.* 2019, 689, 457–468, doi:10.1016/j.scitotenv.2019.06.235.
193. Zhao, Y.; Cho, C.W.; Cui, L.; Wei, W.; Cai, J.; Wu, G.; Yun, Y.S. Adsorptive Removal of Endocrine-Disrupting Compounds and a Pharmaceutical Using Activated Charcoal from Aqueous Solution: Kinetics, Equilibrium, and Mechanism Studies. *Environ. Sci. Pollut. Res.* 2019, 26, 33897–33905, doi:10.1007/s11356-018-2617-7.
194. Chatzimarkou, A.; Stalikas, C. Adsorptive Removal of Estriol from Water Using Graphene-Based Materials and Their Magnetite Composites: Heterogeneous Fenton-Like Non-Toxic Degradation on Magnetite/Graphene Oxide. *Int J Environ Res* 2020, 14, 269–287, doi:10.1007/s41742-020-00255-4.
195. Vieira, W.T.; de Farias, M.B.; Spaolonzi, M.P.; da Silva, M.G.C.; Vieira, M.G.A. Removal of Endocrine Disruptors in Waters by Adsorption, Membrane Filtration and Biodegradation. A Review. *Environ Chem Lett* 2020, 18, 1113–1143, doi:10.1007/s10311-020-01000-1.
196. Dai, R.; Han, H.; Wang, T.; Li, X.; Wang, Z. Enhanced Removal of Hydrophobic Endocrine Disrupting Compounds from Wastewater by Nanofiltration Membranes Intercalated with Hydrophilic MoS<sub>2</sub> Nanosheets: Role of Surface Properties and Internal Nanochannels. *J Memb Sci* 2021, 628, 119267, doi:10.1016/j.memsci.2021.119267.
197. Aziz, M.; Ojumu, T. Exclusion of Estrogenic and Androgenic Steroid Hormones from Municipal Membrane Bioreactor Wastewater Using UF/NF/RO Membranes for Water Reuse Application. *Membranes (Basel)* 2020, 10, 119267, doi:10.3390/membranes10030037.
198. Noutsopoulos, C.; Mamais, D.; Samaras, V.; Bouras, T.; Marneri, M.; Antoniou, K. Effect of Wastewater Chlorination on Endocrine Disruptor Removal. *Water Sci. Technol.* 2013, 67, 1551–1556, doi:10.2166/wst.2013.025.
199. Noutsopoulos, C.; Koumaki, E.; Mamais, D.; Nika, M.C.; Bletsou, A.A.; Thomaidis, N.S. Removal of Endocrine Disruptors and Non-Steroidal Anti-Inflammatory Drugs through Wastewater Chlorination: The Effect of PH, Total Suspended Solids and Humic Acids and Identification of Degradation by-

- Products. *Chemosphere* 2015, 119, S109–S114, doi:10.1016/j.chemosphere.2014.04.107.
200. Dogruel, S.; Cetinkaya Atesci, Z.; Aydin, E.; Pehlivanoglu-Mantas, E. Ozonation in Advanced Treatment of Secondary Municipal Wastewater Effluents for the Removal of Micropollutants. *Environ. Sci. Pollut. Res.* 2020, 27, 45460–45475, doi:10.1007/s11356-020-10339-5.
  201. Gao, X.; Kang, S.; Xiong, R.; Chen, M. Environment-Friendly Removal Methods for Endocrine Disrupting Chemicals. *Sustainability (Switzerland)* 2020, 12, 7615, doi:10.3390/su12187615.
  202. Vela, N.; Calín, M.; Yáñez-Gascón, M.J.; el Aatik, A.; Garrido, I.; Pérez-Lucas, G.; Fenoll, J.; Navarro, S. Removal of Pesticides with Endocrine Disruptor Activity in Wastewater Effluent by Solar Heterogeneous Photocatalysis Using ZnO/Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>8</sub>. *Water Air Soil Pollut* 2019, 230, 1–11, doi:10.1007/s11270-019-4185-y.
  203. Maher, E.K.; O'Malley, K.N.; Heffron, J.; Huo, J.; Wang, Y.; Mayer, B.K.; McNamara, P.J. Removal of Estrogenic Compounds: Via Iron Electrocoagulation: Impact of Water Quality and Assessment of Removal Mechanisms. *Environ Sci (Camb)* 2019, 5, 956–966, doi:10.1039/c9ew00087a.
  204. Calzadilla, W.; Espinoza, L.C.; Diaz-Cruz, M.S.; Sunyer, A.; Aranda, M.; Peña-Farfal, C.; Salazar, R. Simultaneous Degradation of 30 Pharmaceuticals by Anodic Oxidation: Main Intermediaries and by-Products. *Chemosphere* 2021, 269, 128753, doi:10.1016/j.chemosphere.2020.128753.
  205. Rudling, L.; Solyom, P. The Investigation of Biodegradability of Branched Nonyl Phenol Ethoxylates. *Water Res* 1974, 8, 115–119, doi:10.1016/0043-1354(74)90136-5.
  206. Nakada, N.; Tanishima, T.; Shinohara, H.; Kiri, K.; Takada, H. Pharmaceutical Chemicals and Endocrine Disrupters in Municipal Wastewater in Tokyo and Their Removal during Activated Sludge Treatment. *Water Res* 2006, 40, 3297–3303, doi:10.1016/j.watres.2006.06.039.
  207. Martins, D.S.; Estevam, B.R.; Perez, I.D.; Américo-Pinheiro, J.H.P.; Isique, W.D.; Boina, R.F. Sludge from a Water Treatment Plant as an Adsorbent of Endocrine Disruptors. *J Environ Chem Eng* 2022, 10, 108090, doi:10.1016/j.jece.2022.108090.
  208. Basile, T.; Petrella, A.; Petrella, M.; Boghetich, G.; Petruzzelli, V.; Colasuonno, S.; Petruzzelli, D. Review of Endocrine-Disrupting-Compound Removal Technologies in Water and Wastewater Treatment Plants: An EU Perspective. *Ind Eng Chem Res* 2011, 50, 8389–8401, doi:10.1021/ie101919v.

209. Sari Erkan, H.; Bakaraki Turan, N.; Önköl Engin, G. *Membrane Bioreactors for Wastewater Treatment*; IWA publishing, 2000; Vol. 81;.
210. Sözüdoğru, O.; Koçoğlu, E.S.; Yılmaz, A.E.; Bakırdere, S.; Komesli, O.T. Performance Evaluation of A/O Membrane Bioreactor System in the Effective Removal of Endocrine-Disrupting Chemicals: The Effect of SRT and Flux Rate. *Water Air Soil Pollut* 2022, 233, 119, doi:10.1007/s11270-022-05595-9.
211. Mohebzadeh, T.; Mehdi Taghizadeh, M.; Takdastan, A.; Dehghani, M. Comparing the Performance of Wastewater Treatment Using Activated Sludge and Aerated Lagoons Processes in the Removal Efficiency of Estradiol Hormones. *Jundishapur J Health* 2013, 5, 149–156.
212. Samaras, V.G.; Stasinakis, A.S.; Mamais, D.; Thomaidis, N.S.; Lekkas, T.D. Fate of Selected Pharmaceuticals and Synthetic Endocrine Disrupting Compounds during Wastewater Treatment and Sludge Anaerobic Digestion. *J Hazard Mater* 2013, 244–245, 259–267, doi:10.1016/j.jhazmat.2012.11.039.
213. Paterakis, N.; Chiu, T.Y.; Koh, Y.K.K.; Lester, J.N.; McAdam, E.J.; Scrimshaw, M.D.; Soares, A.; Cartmell, E. The Effectiveness of Anaerobic Digestion in Removing Estrogens and Nonylphenol Ethoxylates. *J Hazard Mater* 2012, 199–200, 88–95, doi:10.1016/j.jhazmat.2011.10.075.
214. Lzaod, S.; Dutta, T. Biotransformation of 4, 4'-Dihydroxybiphenyl and Dienestrol by Laccase from *Trametes Versicolor*. *J. Hazard. Mater. Adv.* 2022, 8, 100169, doi:10.1016/j.hazadv.2022.100169.
215. Kasonga, T.K.; Coetzee, M.A.A.; Van Zijl, C.; Momba, M.N.B. Removal of Pharmaceutical' Estrogenic Activity of Sequencing Batch Reactor Effluents Assessed in the T47D-KBluc Reporter Gene Assay. *J Environ Manage* 2019, 240, 209–218, doi:10.1016/j.jenvman.2019.03.113.
216. Debs, K.B.; da Silva, H.D.T.; de Lourdes Leite de Moraes, M.; Carrilho, E.N.V.M.; Lemos, S.G.; Labuto, G. Biosorption of 17 $\alpha$ -Ethinylestradiol by Yeast Biomass from Ethanol Industry in the Presence of Estrone. *Environ. Sci. Pollut. Res.* 2019, 26, 28419–28428, doi:10.1007/s11356-019-05202-1.
217. Eltoukhy, A.; Jia, Y.; Nahurira, R.; Abo-Kadoun, M.A.; Khokhar, I.; Wang, J.; Yan, Y. Biodegradation of Endocrine Disruptor Bisphenol A by *Pseudomonas Putida* Strain YC-AE1 Isolated from Polluted Soil, Guangdong, China. *BMC Microbiol* 2020, 20, 1–14, doi:10.1186/s12866-020-1699-9.
218. Palma, T.L.; Shylova, A.; Costa, M.C. Isolation and Characterization of Bacteria from Activated Sludge Capable of Degrading 17 $\alpha$ -Ethinylestradiol, a Contaminant of High Environmental Concern. *Microbiology (United Kingdom)* 2021, 167, 001038, doi:10.1099/mic.0.001038.

219. Ahn, H.J.; Yadav, N.; Tanpure, R.; Basak, B.; Kurade, M.B.; Xiong, J.Q.; Salama, E.S.; Li, X.; Chung, W.J.; Jeon, B.H. Assessing Ecotoxicity, Removal Efficiency, and Molecular Response of Freshwater Microalgae to Bisphenol AP. *Chem. Eng. J.* 2024, 497, 154760, doi:10.1016/j.cej.2024.154760.
220. Huang, B.; Tang, J.; He, H.; Gu, L.; Pan, X. Ecotoxicological Effects and Removal of 17 $\beta$ -Estradiol in Chlorella Algae. *Ecotoxicol Environ Saf* 2019, 174, 377–383, doi:10.1016/j.ecoenv.2019.01.129.
221. Fu, W.; Li, X.; Yang, Y.; Song, D. Enhanced Degradation of Bisphenol A: Influence of Optimization of Removal, Kinetic Model Studies, Application of Machine Learning and Microalgae-Bacteria Consortia. *Sci Total Environ* 2023, 858, 159876, doi:10.1016/j.scitotenv.2022.159876.
222. Wang, Y.; Ma, J.; Chu, H.; Zhou, X.; Zhang, Y. Advances in Microalgae-Based Livestock Wastewater Treatment: Mechanisms of Pollutants Removal, Effects of Inhibitory Components and Enhancement Strategies. *Chem. Eng. J.* 2024, 483, 149222, doi:10.1016/j.cej.2024.149222.
223. Khavari, F.; Saidijam, M.; Taheri, M.; Nouri, F. Microalgae: Therapeutic Potentials and Applications. *Mol Biol Rep* 2021, 48, 4757–4765, doi:10.1007/s11033-021-06422-w.
224. Thoré, E.S.J.; Muylaert, K.; Bertram, M.G.; Brodin, T. Microalgae. *Curr. Biol.* 2023, 33, R91–R95, doi:10.1016/j.cub.2022.12.032.
225. Dolganyuk, V.; Belova, D.; Babich, O.; Prosekov, A.; Ivanova, S.; Katserov, D.; Patyukov, N.; Sukhikh, S. Microalgae: A Promising Source of Valuable Bioproducts. *Biomolecules* 2020, 10, 1153, doi:10.3390/biom10081153.
226. Garrido-Cardenas, J.A.; Manzano-Agugliaro, F.; Acien-Fernandez, F.G.; Molina-Grima, E. Microalgae Research Worldwide. *Algal Res* 2018, 35, 50–60, doi:10.1016/j.algal.2018.08.005.
227. Peng, L.; Fu, D.; Chu, H.; Wang, Z.; Qi, H. Biofuel Production from Microalgae: A Review. *Environ Chem Lett* 2020, 18, 285–297, doi:10.1007/s10311-019-00939-0.
228. Koyande, A.K.; Chew, K.W.; Rambabu, K.; Tao, Y.; Chu, D.T.; Show, P.L. Microalgae: A Potential Alternative to Health Supplementation for Humans. *Food Sci. Hum. Wellness* 2019, 8, 16–24, doi:10.1016/j.fshw.2019.03.001.
229. Chowdury, K.H.; Nahar, N.; Deb, U.K. The Growth Factors Involved in Microalgae Cultivation for Biofuel Production: A Review. *Computational Water, Energy, and Environmental Engineering* 2020, 09, 185–215, doi:10.4236/cweee.2020.94012.

230. Wu, L.F.; Chen, P.C.; Lee, C.M. The Effects of Nitrogen Sources and Temperature on Cell Growth and Lipid Accumulation of Microalgae. *Int Biodeterior Biodegradation* 2013, 85, 506–510, doi:10.1016/j.ibiod.2013.05.016.
231. Chaisutyakorn, P.; Praiboon, J.; Kaewsuralikhit, C. The Effect of Temperature on Growth and Lipid and Fatty Acid Composition on Marine Microalgae Used for Biodiesel Production. *J. Appl. Phycol.* 2018, 30, 37–45, doi:10.1007/s10811-017-1186-3.
232. Su, Y. Revisiting Carbon, Nitrogen, and Phosphorus Metabolisms in Microalgae for Wastewater Treatment. *Sci. Total Environ.* 2021, 762, 144590, doi:10.1016/j.scitotenv.2020.144590.
233. Aditya, L.; Vu, H.P.; Abu Hasan Johir, M.; Mahlia, T.M.I.; Silitonga, A.S.; Zhang, X.; Liu, Q.; Tra, V.T.; Ngo, H.H.; Nghiem, L.D. Role of Culture Solution PH in Balancing CO<sub>2</sub> Input and Light Intensity for Maximising Microalgae Growth Rate. *Chemosphere* 2023, 343, 140255, doi:10.1016/j.chemosphere.2023.140255.
234. Rehman, M.; Kesharvani, S.; Dwivedi, G.; Gidwani Suneja, K. Impact of Cultivation Conditions on Microalgae Biomass Productivity and Lipid Content. *Mater Today Proc* 2022, 56, 282–290, doi:10.1016/j.matpr.2022.01.152.
235. Qiu, R.; Gao, S.; Lopez, P.A.; Ogden, K.L. Effects of PH on Cell Growth, Lipid Production and CO<sub>2</sub> Addition of Microalgae *Chlorella Sorokiniana*. *Algal Res* 2017, 28, 192–199, doi:10.1016/j.algal.2017.11.004.
236. Filali R; Tian H; Micheils E; Taidi B Evaluation of the Growth Performance of Microalgae Based on Fine PH Changes. *Austin J. Biomed. Eng.* 2021, 2021, doi:10.26420/austin.
237. Haris, N.; Manan, H.; Jusoh, M.; Khatoon, H.; Katayama, T.; Kasan, N.A. Effect of Different Salinity on the Growth Performance and Proximate Composition of Isolated Indigenous Microalgae Species. *Aquac Rep* 2022, 22, 100925, doi:10.1016/j.aqrep.2021.100925.
238. Masojídek, J.; Torzillo, G.; Koblízek, M. Photosynthesis in Microalgae. In *Handbook of Microalgal Culture: Applied Phycology and Biotechnology: Second Edition*; John Wiley & Sons, 2013; pp. 21–36.
239. Parveen, A.; Bhatnagar, P.; Gautam, P.; Bisht, B.; Nanda, M.; Kumar, S.; Vlaskin, M.S.; Kumar, V. Enhancing the Bio-Prospective of Microalgae by Different Light Systems and Photoperiods. *Photochem. Photobiol. Sci.* 2023, 22, 2687–2698, doi:10.1007/s43630-023-00471-9.

240. Verma, R.; Kumari, K.V.L.K.; Srivastava, A.; Kumar, A. Photoautotrophic, Mixotrophic, and Heterotrophic Culture Media Optimization for Enhanced Microalgae Production. *J Environ Chem Eng* 2020, 8, 104149, doi:10.1016/j.jece.2020.104149.
241. Costa, J.A.V.; de Moraes, M.G. An Open Pond System for Microalgal Cultivation. In *Biofuels from Algae*; Elsevier, 2013; pp. 1–22.
242. Pal, R.; Satpati, G.G. Microalgae-Biomass to Biodiesel: A Review. *J. Algal Biomass Utln* 2018, 9, 11–37.
243. Rayen, F.; Behnam, T.; Dominique, P. Optimization of a Raceway Pond System for Wastewater Treatment: A Review. *Crit Rev Biotechnol* 2019, 39, 422–435, doi:10.1080/07388551.2019.1571007.
244. Y. Shen; W. Yuan; Z. J. Pei; Q. Wu; E. Mao Microalgae Mass Production Methods. *Trans ASABE* 2009, 52, 1275–1287, doi:10.13031/2013.27771.
245. Al-Dailami, A.; Koji, I.; Ahmad, I.; Goto, M. Potential of Photobioreactors (PBRs) in Cultivation of Microalgae. *J. Adv. Res. Appl. Sci. Eng. Technol.* 2022, 27, 32–44, doi:10.37934/araset.27.1.3244.
246. Huo, S.; Wang, Z.; Zhu, S.; Shu, Q.; Zhu, L.; Qin, L.; Zhou, W.; Feng, P.; Zhu, F.; Yuan, Z.; et al. Biomass Accumulation of *Chlorella Zofingiensis* G1 Cultures Grown Outdoors in Photobioreactors. *Front Energy Res* 2018, 6, 49, doi:10.3389/fenrg.2018.00049.
247. Alaswad, A.; Dassisti, M.; Prescott, T.; Olabi, A.G. Technologies and Developments of Third Generation Biofuel Production. *Renew. Sustain. Energy Rev.* 2015, 51, 1446–1460, doi:10.1016/j.rser.2015.07.058.
248. Koller, A.P.; Wolf, L.; Brück, T.; Weuster-Botz, D. Studies on the Scale-up of Biomass Production with *Scenedesmus* Spp. in Flat-Plate Gas-Lift Photobioreactors. *Bioprocess Biosyst Eng* 2018, 41, 213–220, doi:10.1007/s00449-017-1859-y.
249. Egbo, M.K.; Okoani, A.O.; Okoh, I.E. Photobioreactors for Microalgae Cultivation – An Overview. *Ijser* 2018, 9, 65–74.
250. Deprá, M.C.; Mérida, L.G.R.; de Menezes, C.R.; Zepka, L.Q.; Jacob-Lopes, E. A New Hybrid Photobioreactor Design for Microalgae Culture. *Chem. Eng. Res. Des.* 2019, 144, 1–10, doi:10.1016/j.cherd.2019.01.023.
251. Tran, D.T.; Van Do, T.C.; Nguyen, Q.T.; Le, T.G. Simultaneous Removal of Pollutants and High Value Biomaterials Production by *Chlorella Variabilis* TH03 from Domestic Wastewater. *Clean Technol Environ Policy* 2021, 23, 3–17, doi:10.1007/s10098-020-01810-5.

252. Ling, Y.; Sun, L. ping; Wang, S. ying; Lin, C.S.K.; Sun, Z.; Zhou, Z. gang Cultivation of Oleaginous Microalga *Scenedesmus Obliquus* Coupled with Wastewater Treatment for Enhanced Biomass and Lipid Production. *Biochem Eng J* 2019, 148, 162–169, doi:10.1016/j.bej.2019.05.012.
253. Hawrot-Paw, M.; Koniuszy, A.; Gątczynska, M.; Zajac, G.; Szyszlak-Bargłowicz, J. Production of Microalgal Biomass Using Aquaculture Wastewater as Growth Medium. *Water (Switzerland)* 2020, 12, 106, doi:10.3390/w12010106.
254. Arias, D.M.; Solé-Bundó, M.; Garfí, M.; Ferrer, I.; García, J.; Uggetti, E. Integrating Microalgae Tertiary Treatment into Activated Sludge Systems for Energy and Nutrients Recovery from Wastewater. *Bioresour Technol* 2018, 247, 513–519, doi:10.1016/j.biortech.2017.09.123.
255. Bano, F.; Malik, A.; Ahammad, S.Z. Removal of Estradiol, Diclofenac, and Triclosan by Naturally Occurring Microalgal Consortium Obtained from Wastewater. *Sustainability (Switzerland)* 2021, 13, 7690, doi:10.3390/su13147690.
256. Li, S.; Chu, R.; Hu, D.; Yin, Z.; Mo, F.; Hu, T.; Liu, C.; Zhu, L. Combined Effects of 17 $\beta$ -Estradiol and Copper on Growth, Biochemical Characteristics and Pollutant Removals of Freshwater Microalgae *Scenedesmus Dimorphus*. *Sci. Total Environ.* 2020, 730, 138597, doi:10.1016/j.scitotenv.2020.138597.
257. Abargues, M.R.; Giménez, J.B.; Ferrer, J.; Bouzas, A.; Seco, A. Endocrine Disrupter Compounds Removal in Wastewater Using Microalgae: Degradation Kinetics Assessment. *Chem. Eng. J* 2018, 334, 313–321, doi:10.1016/j.cej.2017.09.187.
258. Bai, X.; Acharya, K. Removal of Seven Endocrine Disrupting Chemicals (EDCs) from Municipal Wastewater Effluents by a Freshwater Green Alga. *Environ. Pollut.* 2019, 247, 534–540, doi:10.1016/j.envpol.2019.01.075.
259. Liu, W.; Chen, Q.; He, N.; Sun, K.; Sun, D.; Wu, X.; Duan, S. Removal and Biodegradation of 17 $\beta$ -Estradiol and Diethylstilbestrol by the Freshwater Microalgae *Raphidocelis Subcapitata*. *Int J Environ Res Public Health* 2018, 15, 452, doi:10.3390/ijerph15030452.
260. Wang, L.; Xiao, H.; He, N.; Sun, D.; Duan, S. Biosorption and Biodegradation of the Environmental Hormone Nonylphenol By Four Marine Microalgae. *Sci Rep* 2019, 9, 5277, doi:10.1038/s41598-019-41808-8.
261. Ruksrithong, C.; Phattarapattamawong, S. Removals of Estrone and 17 $\beta$ -Estradiol by Microalgae Cultivation: Kinetics and Removal Mechanisms. *Environ Technol (U. K.)* 2019, 40, 163–170, doi:10.1080/09593330.2017.1384068.

262. Liu, D.; Yang, W.; Lv, Y.; Li, S.; Qv, M.; Dai, D.; Zhu, L. Pollutant Removal and Toxic Response Mechanisms of Freshwater Microalgae *Chlorella Sorokiniana* under Exposure of Tetrabromobisphenol A and Cadmium. *Chem. Eng. J.* 2023, 461, 142065, doi:10.1016/j.cej.2023.142065.
263. Cheng, J.; Ye, Q.; Li, K.; Liu, J.; Zhou, J. Removing Ethinylestradiol from Wastewater by Microalgae Mutant *Chlorella* PY-ZU1 with CO<sub>2</sub> Fixation. *Bioresour Technol* 2018, 249, 284–289, doi:10.1016/j.biortech.2017.10.036.
264. Chang, X.; He, Y.; Song, L.; Ding, J.; Ren, S.; Lv, M.; Chen, L. Methylparaben Toxicity and Its Removal by Microalgae *Chlorella Vulgaris* and *Phaeodactylum Tricornutum*. *J Hazard Mater* 2023, 454, 131528, doi:10.1016/j.jhazmat.2023.131528.
265. Wu, X.; Wang, Y.; Meador, J.P.; Zhou, G.-J.; Xu, W.; Hua, F.; Liu, W.; Liu, X.; Wang, Z. Biodegradation Pathways and Mechanisms of 17 $\alpha$ -Ethinylestradiol via Functional Enzymes in the Freshwater Microalga *Scenedesmus Quadricauda*. *Water Res* 2025, 123569, doi:10.1016/j.watres.2025.123569.
266. Narindri Rara Winayu, B.; Chu, F.J.; Sutopo, C.C.Y.; Chu, H. Bioprospecting Photosynthetic Microorganisms for the Removal of Endocrine Disruptor Compounds. *World J Microbiol Biotechnol* 2024, 40, 120, doi:10.1007/s11274-024-03910-6.
267. Maryjoseph, S.; Ketheesan, B. Microalgae Based Wastewater Treatment for the Removal of Emerging Contaminants: A Review of Challenges and Opportunities. *Case Stud. Chem. Environ. Eng.* 2020, 2, 142065, doi:10.1016/j.cscee.2020.100046.
268. Chew, K.W.; Yap, J.Y.; Show, P.L.; Suan, N.H.; Juan, J.C.; Ling, T.C.; Lee, D.J.; Chang, J.S. Microalgae Biorefinery: High Value Products Perspectives. *Bioresour Technol* 2017, 229, 53–62, doi:10.1016/j.biortech.2017.01.006.
269. Okeke, E.S.; Ejeromedoghene, O.; Okoye, C.O.; Ezeorba, T.P.C.; Nyaruaba, R.; Ikechukwu, C.K.; Oladipo, A.; Orege, J.I. Microalgae Biorefinery: An Integrated Route for the Sustainable Production of High-Value-Added Products. *Energy Convers. Manag.: X* 2022, 16, 100323, doi:10.1016/j.ecmx.2022.100323.
270. Bhatia, S.K.; Mehariya, S.; Bhatia, R.K.; Kumar, M.; Pugazhendhi, A.; Awasthi, M.K.; Atabani, A.E.; Kumar, G.; Kim, W.; Seo, S.O.; et al. Wastewater Based Microalgal Biorefinery for Bioenergy Production: Progress and Challenges. *Sci Total Environ* 2021, 751, 141599, doi:10.1016/j.scitotenv.2020.141599.
271. Zabed, H.M.; Akter, S.; Yun, J.; Zhang, G.; Zhang, Y.; Qi, X. Biogas from Microalgae: Technologies, Challenges and Opportunities. *Renew Sustain Energy Rev* 2020, 117, 109503, doi:10.1016/j.rser.2019.109503.

272. Laiq Ur Rehman, M.; Iqbal, A.; Chang, C.C.; Li, W.; Ju, M. Anaerobic Digestion. *Water Environment Research* 2019, *91*, 1253–1271.
273. Uddin, M.M.; Wright, M.M. Anaerobic Digestion Fundamentals, Challenges, and Technological Advances. *Phys. Sci. Rev.* 2023, *8*, 2819–2837, doi:10.1515/psr-2021-0068.
274. Golueke, C.G.; Oswald, W.J.; Gotaas, H.B. Anaerobic Digestion of Algae. *Appl Microbiol* 1957, *5*, 47–55, doi:10.1128/aem.5.1.47-55.1957.
275. Vargas-Estrada, L.; Longoria, A.; Arenas, E.; Moreira, J.; Okoye, P.U.; Bustos-Terrones, Y.; Sebastian, P.J. A Review on Current Trends in Biogas Production from Microalgae Biomass and Microalgae Waste by Anaerobic Digestion and Co-Digestion. *Bioenergy Res.* 2022, *15*, 77–92, doi:10.1007/s12155-021-10276-2.
276. Frigon, J.C.; Matteau-Lebrun, F.; Hamani Abdou, R.; McGinn, P.J.; O’Leary, S.J.B.; Guiot, S.R. Screening Microalgae Strains for Their Productivity in Methane Following Anaerobic Digestion. *Appl Energy* 2013, *108*, 100–107, doi:10.1016/j.apenergy.2013.02.051.
277. Mussgnug, J.H.; Klassen, V.; Schlüter, A.; Kruse, O. Microalgae as Substrates for Fermentative Biogas Production in a Combined Biorefinery Concept. *J Biotechnol* 2010, *150*, 51–56, doi:10.1016/j.jbiotec.2010.07.030.
278. Passos, F.; Hom-Díaz, A.; Blázquez, P.; Vicent, T.; Ferrer, I. Improving Biogas Production from Microalgae by Enzymatic Pretreatment. *Bioresour Technol* 2016, *199*, 347–351, doi:10.1016/j.biortech.2015.08.084.
279. Calicioglu, O.; Demirel, G.N. Biogas Production from Waste Microalgal Biomass Obtained from Nutrient Removal of Domestic Wastewater. *Waste Biomass Valorization* 2016, *7*, 1397–1408, doi:10.1007/s12649-016-9546-9.
280. Solé-Bundó, M.; Garfí, M.; Matamoros, V.; Ferrer, I. Co-Digestion of Microalgae and Primary Sludge: Effect on Biogas Production and Microcontaminants Removal. *Sci Total Environ* 2019, *660*, 974–981, doi:10.1016/j.scitotenv.2019.01.011.
281. Hu, Y.; Kumar, M.; Wang, Z.; Zhan, X.; Stengel, D.B. Filamentous Microalgae as an Advantageous Co-Substrate for Enhanced Methane Production and Digestate Dewaterability in Anaerobic Co-Digestion of Pig Manure. *Waste Manag.* 2021, *119*, 399–407, doi:10.1016/j.wasman.2020.10.041.
282. González-González, L.M.; Zhou, L.; Astals, S.; Thomas-Hall, S.R.; Eltanahy, E.; Pratt, S.; Jensen, P.D.; Schenk, P.M. Biogas Production Coupled to Repeat

- Microalgae Cultivation Using a Closed Nutrient Loop. *Bioresour Technol* 2018, 263, 625–630, doi:10.1016/j.biortech.2018.05.039.
283. Klassen, V.; Blifernez-Klassen, O.; Bax, J.; Kruse, O. Wastewater-Borne Microalga *Chlamydomonas* Sp.: A Robust Chassis for Efficient Biomass and Biomethane Production Applying Low-N Cultivation Strategy. *Bioresour Technol* 2020, 315, 123825, doi:10.1016/j.biortech.2020.123825.
  284. Prajapati, S.K.; Malik, A.; Vijay, V.K. Comparative Evaluation of Biomass Production and Bioenergy Generation Potential of *Chlorella* Spp. through Anaerobic Digestion. *Appl Energy* 2014, 114, 790–797, doi:10.1016/j.apenergy.2013.08.021.
  285. Kwietniewska, E.; Tys, J. Process Characteristics, Inhibition Factors and Methane Yields of Anaerobic Digestion Process, with Particular Focus on Microalgal Biomass Fermentation. *Renew. Sustain. Energy Rev.* 2014, 34, 491–500, doi:10.1016/j.rser.2014.03.041.
  286. de Carvalho, J.C.; Magalhães, A.I.; de Melo Pereira, G.V.; Medeiros, A.B.P.; Sydney, E.B.; Rodrigues, C.; Aulestia, D.T.M.; de Souza Vandenberghe, L.P.; Soccol, V.T.; Soccol, C.R. Microalgal Biomass Pretreatment for Integrated Processing into Biofuels, Food, and Feed. *Bioresour Technol* 2020, 300, 122719, doi:10.1016/j.biortech.2019.122719.
  287. de Oliveira, M.C.; Bassin, I.D.; Cammarota, M.C. Microalgae and Cyanobacteria Biomass Pretreatment Methods: A Comparative Analysis of Chemical and Thermochemical Pretreatment Methods Aimed at Methane Production. *Fermentation* 2022, 8, 497, doi:10.3390/fermentation8100497.
  288. Jankowska, E.; Sahu, A.K.; Oleskowicz-Popiel, P. Biogas from Microalgae: Review on Microalgae's Cultivation, Harvesting and Pretreatment for Anaerobic Digestion. *Renew. Sustain. Energy Rev.* 2017, 75, 692–709, doi:10.1016/j.rser.2016.11.045.
  289. Dębowski, M.; Kazimierowicz, J.; Świca, I.; Zieliński, M. Ultrasonic Disintegration to Improve Anaerobic Digestion of Microalgae with Hard Cell Walls—*Scenedesmus* Sp. and *Pinnularia* Sp. *Plants* 2023, 12, 53, doi:10.3390/plants12010053.
  290. Passos, F.; Solé, M.; García, J.; Ferrer, I. Biogas Production from Microalgae Grown in Wastewater: Effect of Microwave Pretreatment. *Appl Energy* 2013, 108, 168–175, doi:10.1016/j.apenergy.2013.02.042.
  291. Abusweireh, R.S.; Rajamohan, N.; Sonne, C.; Vasseghian, Y. Algae Biogas Production Focusing on Operating Conditions and Conversion Mechanisms – A Review. *Heliyon* 2023, 9, doi:10.1016/j.heliyon.2023.e17757.

292. Wang, M.; Lee, E.; Dilbeck, M.P.; Liebelt, M.; Zhang, Q.; Ergas, S.J. Thermal Pretreatment of Microalgae for Biomethane Production: Experimental Studies, Kinetics and Energy Analysis. *J. Chem. Technol. Biotechnol.* 2017, 92, 399–407, doi:10.1002/jctb.5018.
293. Kendir, E.; Ugurlu, A. A Comprehensive Review on Pretreatment of Microalgae for Biogas Production. *Int J Energy Res* 2018, 42, 3711–3731, doi:10.1002/er.4100.
294. Passos, F.; Uggetti, E.; Carrère, H.; Ferrer, I. Pretreatment of Microalgae to Improve Biogas Production: A Review. *Bioresour Technol* 2014, 172, 403–412, doi:10.1016/j.biortech.2014.08.114.
295. Passos, F.; Carretero, J.; Ferrer, I. Comparing Pretreatment Methods for Improving Microalgae Anaerobic Digestion: Thermal, Hydrothermal, Microwave and Ultrasound. *Chem. Eng. J.* 2015, 279, 667–672, doi:10.1016/j.cej.2015.05.065.
296. Dar, R.A.; Phutela, U.G. Enzymatic and Hydrothermal Pretreatment of Newly Isolated Spirulina Subsalsa BGLR6 Biomass for Enhanced Biogas Production. *Waste Biomass Valorization* 2020, 11, 3639–3651, doi:10.1007/s12649-019-00712-y.
297. Kendir Çakmak, E.; Ugurlu, A. Enhanced Biogas Production of Red Microalgae via Enzymatic Pretreatment and Preliminary Economic Assessment. *Algal Res* 2020, 50, 101979, doi:10.1016/j.algal.2020.101979.
298. Cho, S.; Park, S.; Seon, J.; Yu, J.; Lee, T. Evaluation of Thermal, Ultrasonic and Alkali Pretreatments on Mixed-Microalgal Biomass to Enhance Anaerobic Methane Production. *Bioresour Technol* 2013, 143, 330–336, doi:10.1016/j.biortech.2013.06.017.
299. Solé, A.; Matamoros, V. Removal of Endocrine Disrupting Compounds from Wastewater by Microalgae Co-Immobilized in Alginate Beads. *Chemosphere* 2016, 164, 516–523, doi:10.1016/j.chemosphere.2016.08.047.
300. Prosenc, F.; Piechocka, J.; Škufca, D.; Heath, E.; Griessler Bulc, T.; Istenič, D.; Buttiglieri, G. Microalgae-Based Removal of Contaminants of Emerging Concern: Mechanisms in Chlorella Vulgaris and Mixed Algal-Bacterial Cultures. *J Hazard Mater* 2021, 418, 126284, doi:10.1016/j.jhazmat.2021.126284.
301. Amaral, E.T.; Bender, L.B.Y.C.; Rizzetti, T.M.; Schneider, R. de C. de S. Removal of Organic Contaminants in Water Bodies or Wastewater by Microalgae of the Genus Chlorella: A Review. *Case Stud. Chem. Environ. Eng.* 2023, 8, 100476, doi:10.1016/j.cscee.2023.100476.

302. Wang, P.; Wong, Y.S.; Tam, N.F.Y. Green Microalgae in Removal and Biotransformation of Estradiol and Ethinylestradiol. *J Appl Phycol* 2017, 29, 263–273, doi:10.1007/s10811-016-0960-y.
303. Asadi, P.; Rad, H.A.; Qaderi, F. Lipid and Biodiesel Production by Cultivation Isolated Strain *Chlorella Sorokiniana* Pa.91 and *Chlorella Vulgaris* in Dairy Wastewater Treatment Plant Effluents. *J Environ Health Sci Eng* 2020, 18, 573–585, doi:10.1007/s40201-020-00483-y.
304. Wen, Y.; He, Y.; Ji, X.; Li, S.; Chen, L.; Zhou, Y.; Wang, M.; Chen, B. Isolation of an Indigenous *Chlorella Vulgaris* from Swine Wastewater and Characterization of Its Nutrient Removal Ability in Undiluted Sewage. *Bioresour Technol* 2017, 243, 247–253, doi:10.1016/j.biortech.2017.06.094.
305. Doria, E.; Longoni, P.; Scibilia, L.; Iazzi, N.; Cella, R.; Nielsen, E. Isolation and Characterization of a *Scenedesmus Acutus* Strain to Be Used for Bioremediation of Urban Wastewater. *J Appl Phycol* 2012, 24, 375–383, doi:10.1007/s10811-011-9759-z.
306. Ometto, F.; Quiroga, G.; Pšenička, P.; Whitton, R.; Jefferson, B.; Villa, R. Impacts of Microalgae Pre-Treatments for Improved Anaerobic Digestion: Thermal Treatment, Thermal Hydrolysis, Ultrasound and Enzymatic Hydrolysis. *Water Res* 2014, 65, 350–361, doi:10.1016/j.watres.2014.07.040.
307. Demuez, M.; Mahdy, A.; Tomás-Pejó, E.; González-Fernández, C.; Ballesteros, M. Enzymatic Cell Disruption of Microalgae Biomass in Biorefinery Processes. *Biotechnol Bioeng* 2015, 112, 1955–1966, doi:10.1002/bit.25644.
308. Proyectos 2020 Sevilla - TeCH4+ Available online: <https://tech4plus.com/proyectos-2020-sevilla/> (accessed on 24 February 2025).
309. Proyectos 2021 Valencia - TeCH4+ Available online: <https://tech4plus.com/proyectos-2023-sevilla-ranilla/> (accessed on 24 February 2025).
310. Sánchez-Bayo, A.; Morales, V.; Rodríguez, R.; Vincente, G.; Bautista, L.F. Effect of Cultivation Variables on Biomass Composition and Growth of Microalgae and Cyanobacteria. *Molecules* 2020, 25, doi:10.20944/preprints201911.0108.v1.
311. Songserm, R.; Nishiyama, Y.; Sanevas, N. Light Influences the Growth, Pigment Synthesis, Photosynthesis Capacity, and Antioxidant Activities in *Scenedesmus Falcatus*. *Scientifica (Cairo)* 2024, 2024, 1898624, doi:10.1155/2024/1898624.

312. Gaffet, E.; Bernauer U.; Bodin L.; Chaudhry Q.; Coenraads P.J. *SCCS OPINION on Methylparaben* (CAS No. 99-76-3, EC No. 202-785-7)-SCCS/1652/23–Final Opinion.; 2023;
313. PROPYL PARABEN - Ataman Kimya Available online: [https://www.atamanchemicals.com/propyl-paraben\\_u24500/](https://www.atamanchemicals.com/propyl-paraben_u24500/) (accessed on 2 March 2025).
314. U. Bernauer; L. Bodin; Q. Chaudhry; P.J. Coenraads; M. Dusinska *SCCS OPINION on Butylparaben* (CAS No. 94-26-8, EC No. 202-318-7) - SCCS/1651/23– Final Opinion; 2023;
315. Propyl Paraben | CAS#:94-13-3 | Chemsrsc Available online: [https://www.chemsrc.com/en/cas/94-13-3\\_889352.html](https://www.chemsrc.com/en/cas/94-13-3_889352.html) (accessed on 2 March 2025).
316. Vale, F.; Sousa, C.A.; Sousa, H.; Santos, L.; Simões, M. Impact of Parabens on Microalgae Bioremediation of Wastewaters: A Mechanistic Study. *Chem Eng J* 2022, 442, 136374, doi:10.1016/j.cej.2022.136374.
317. ToxServices LLC *PROPYLPARABEN (CAS #94-13-3) GREENSCREEN ® FOR SAFER CHEMICALS (GREENSCREEN ®) ASSESSMENT*; 2023;
318. Benzophenone | C13H10O | CID 3102 - PubChem Available online: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Benzophenone> (accessed on 3 March 2025).
319. Bisphenol A | C15H16O2 | CID 6623 - PubChem Available online: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/6623> (accessed on 3 March 2025).
320. Estrone | C18H22O2 | CID 5870 - PubChem Available online: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Estrone> (accessed on 3 March 2025).
321. 119-61-9 CAS | BENZOPHENONE | Inorganic Salts | Article No. 01880 Available online: <https://www.lobachemie.com/Inorganic-Salts-01880/BENZOPHENONE-CASNO-119-61-9.aspx> (accessed on 3 March 2025).
322. Shehab, Z.N.; Jamil, N.R.; Aris, A.Z. Occurrence, Environmental Implications and Risk Assessment of Bisphenol A in Association with Colloidal Particles in an Urban Tropical River in Malaysia. *Sci Rep* 2020, 10, 20360, doi:10.1038/s41598-020-77454-8.
323. Arlos, M.J.; Liang, R.; Hatat-Fraile, M.M.; Bragg, L.M.; Zhou, N.Y.; Servos, M.R.; Andrews, S.A. Photocatalytic Decomposition of Selected Estrogens and Their Estrogenic Activity by UV-LED Irradiated TiO2 Immobilized on Porous Titanium

- Sheets via Thermal-Chemical Oxidation. *J Hazard Mater* 2016, 318, 541–550, doi:10.1016/j.jhazmat.2016.07.048.
324. Shrivastava, A.; Gupta, V.B. HPLC: Isocratic or Gradient Elution and Assessment of Linearity In Analytical Methods. *J Adv Sci Res* 2012, 3, 12–20.
325. Bose, A. HPLC Calibration Process Parameters in Terms of System Suitability Test. *Austin Chromatography* 2014, 1, 1–4.
326. Shrivastava, A.; Gupta, V. Methods for the Determination of Limit of Detection and Limit of Quantitation of the Analytical Methods. *Chron Young Sci* 2011, 2, 21–25, doi:10.4103/2229-5186.79345.
327. Robles-Heredia, J.C.; Sacramento-Rivero, J.C.; Ruiz-Marín, A.; Baz-Rodríguez, S.; Canedo-López, Y.; Narváez-García, A. Evaluation of Cell Growth, Nitrogen Removal and Lipid Production by *Chlorella Vulgaris* to Different Conditions of Aireation in Two Types of Annular Photobioreactors. *Rev Mex Ing Quim* 2016, 15, 361–377, doi:10.24275/rmiq/bio1045.
328. Hempel, N.; Petrick, I.; Behrendt, F. Biomass Productivity and Productivity of Fatty Acids and Amino Acids of Microalgae Strains as Key Characteristics of Suitability for Biodiesel Production. *J Appl Phycol* 2012, 24, 1407–1418, doi:10.1007/s10811-012-9795-3.
329. Bligh, E.G.; Dyer, W.J. A Rapid Method of Total Lipid Extraction and Purification. *Can J Biochem Physiol* 1959, 37, 911–917, doi:10.1139/o59-099.
330. Dubois, M.; Gilles, K.A.; Hamilton, J.K.; Rebers, P.A.; Smith, F. Colorimetric Method for Determination of Sugars and Related Substances. *Anal Chem* 1956, 28, 350–356, doi:10.1021/ac60111a017.
331. Lowry, O.H.; Rosebrough, N.J.; Farr, A.L.; Randall, R.J. Protein Measurement with the Folin Phenol Reagent. *J Biol Chem* 1951, 193, 265–275, doi:10.1016/s0021-9258(19)52451-6.
332. Monod, J. The Growth of Bacterial Cultures. *Annu Rev Microbiol* 1949, 3, 606, doi:10.1146/annurev.mi.03.100149.002103.
333. Tunay, D.; Yildirim, O.; Ozkaya, B.; Demir, A. Determination of Photoautotrophic Growth and Inhibition Kinetics by the Monod and the Aiba Models and Bioenergetics of Local Microalgae Strain. *Chemosphere* 2022, 292, 133330, doi:10.1016/j.chemosphere.2021.133330.
334. Pazmino-Sosa, A.G.; Blais, J.F.; Champagne, P. Effects of 17 $\alpha$ -Ethinyl Estradiol (EE2) and Removal Potential by Two Microalgal Species *Chlorella Vulgaris* and *Scenedesmus Obliquus*. *Algal Res* 2024, 82, 103634, doi:10.1016/j.algal.2024.103634.

335. Maia, C.; Sousa, C.A.; Sousa, H.; Vale, F.; Simões, M. Parabens Removal from Wastewaters by Microalgae – Ecotoxicity, Metabolism and Pathways. *Chem. Eng. J* 2023, 453, 139631, doi:10.1016/j.cej.2022.139631.
336. Cárdenas Cleves, L.M.; Parra Orobio, B.A.; Torres Lozada, P.; Vásquez Franco, C.H. Perspectivas Del Ensayo de Potencial Bioquímico de Metano - PBM Para El Control Del Proceso de Digestión Anaerobia de Residuos. *Revista ION* 2016, 29, 95–108, doi:10.18273/revion.v29n1-2016008.
337. Sakarika, M.; Kornaros, M. Chlorella Vulgaris as a Green Biofuel Factory: Comparison between Biodiesel, Biogas and Combustible Biomass Production. *Bioresour Technol* 2019, 273, 237–243, doi:10.1016/j.biortech.2018.11.017.
338. Wang, W.; Kannan, K. Fate of Parabens and Their Metabolites in Two Wastewater Treatment Plants in New York State, United States. *Environ Sci Technol* 2016, 50, 1174–1181, doi:10.1021/acs.est.5b05516.
339. Pothitou, P.; Voutsas, D. Endocrine Disrupting Compounds in Municipal and Industrial Wastewater Treatment Plants in Northern Greece. *Chemosphere* 2008, 73, 1716–1723, doi:10.1016/j.chemosphere.2008.09.037.
340. Kasprzyk-Hordern, B.; Dinsdale, R.M.; Guwy, A.J. The Removal of Pharmaceuticals, Personal Care Products, Endocrine Disruptors and Illicit Drugs during Wastewater Treatment and Its Impact on the Quality of Receiving Waters. *Water Res* 2009, 43, 363–380, doi:10.1016/j.watres.2008.10.047.
341. Montes, R.; Quintana, J.B.; Ramil, M.; Rodil, R. Environmental Applications (Water). In *Solid-Phase Extraction*; 2019.
342. Dong, M.W.; Wysocki, J. Ultraviolet Detectors: Perspectives, Principles, and Practices. *LC-GC North America* 2019, 37, 750–759.
343. Han, X.; Chen, J.; Qiu, H.; Shi, Y.P. Solid/Liquid Phase Microextraction of Five Bisphenol-Type Endocrine Disrupting Chemicals by Using a Hollow Fiber Reinforced with Graphene Oxide Nanoribbons, and Determination by HPLC-PDA. *Mikrochim. Acta* 2019, 186, 1–9, doi:10.1007/s00604-019-3498-2.
344. Sungthong, B.; Rattarom, R.; Sato, V.H.; Sato, H. Development and Validation of a New RP-HPLC-UV Method for the Simultaneous Determination of Phenytoin Impurities, Benzophenone, and Benzil. *Acta Chromatogr* 2019, 31, 241–245, doi:10.1556/1326.2018.00447.
345. Kaur, R.; Heena; Kaur, R.; Grover, A.; Rani, S.; Malik, A.K.; Kabir, A.; Furton, K.G. Trace Determination of Parabens in Cosmetics and Personal Care Products Using Fabric-Phase Sorptive Extraction and High-Performance Liquid

- Chromatography with UV Detection. *J Sep Sci* 2020, 43, 2626–2635, doi:10.1002/jssc.201900978.
346. Gülle, S.; Ulusoy, H.I.; Kabir, A.; Tartaglia, A.; Furton, K.G.; Locatelli, M.; Samanidou, V.F. Application of a Fabric Phase Sorptive Extraction-High Performance Liquid Chromatography-Photodiode Array Detection Method for the Trace Determination of Methyl Paraben, Propyl Paraben and Butyl Paraben in Cosmetic and Environmental Samples. *Anal. Methods* 2019, 11, 6136–6145, doi:10.1039/c9ay02260k.
347. Vinković, K.; Rožić, M.; Galić, N. Development and Validation of an HPLC Method for the Determination of Endocrine Disruptors Bisphenol A and Benzophenone in Thermochromic Printing Inks. *J Liq Chromatogr Relat Technol* 2017, 40, 959–966, doi:10.1080/10826076.2017.1391102.
348. Yan, Q.; Yang, L.; Li, S. Solid-Phase Extraction Combined with High Performance Liquid Chromatography-Diode Array Detector for Rapid Determination of Estrogens in Milk. *Trop. J. Pharm. Res.* 2015, 14, 2077–2082, doi:10.4314/tjpr.v14i11.18.
349. Choi, D.Y.; Row, K.H. Theoretical Analysis of Chromatographic Peak Asymmetry and Sharpness by the Moment Method Using Two Peptides. *Biotechnol. Bioprocess Eng.* 2004, 9, 495–499, doi:10.1007/BF02933492.
350. Francisco, M.L. d. L.; Resurreccion, A.V.A. Development of a Reversed-Phase High Performance Liquid Chromatography (RP-HPLC) Procedure for the Simultaneous Determination of Phenolic Compounds in Peanut Skin Extracts. *Food Chem* 2009, 117, 356–363, doi:10.1016/j.foodchem.2009.03.110.
351. Huang, W. Open Tubular Ion Chromatography: A State-of-the-Art Review. *Anal Chim Acta* 2021, 1143, 210–224, doi:10.1016/j.aca.2020.08.012.
352. Chandran, S.; Singh, R.S.P. Comparison of Various International Guidelines for Analytical Method Validation. *Pharmazie* 2007, 62, 4–14, doi:10.1691/ph.2007.1.5064.
353. Schoenmakers, P.J. Criteria for Comparing the Quality of Chromatograms with Great Variations in Capacity Factors. *J Liq Chromatogr* 1987, 10, 1865–1886, doi:10.1080/01483918708066803.
354. Vega-Morales, T.; Sosa-Ferrera, Z.; Santana-Rodríguez, J.J. Determination of Alkylphenol Polyethoxylates, Bisphenol-A, 17 $\alpha$ -Ethinylestradiol and 17 $\beta$ -Estradiol and Its Metabolites in Sewage Samples by SPE and LC/MS/MS. *J Hazard Mater* 2010, 183, 701–711, doi:10.1016/j.jhazmat.2010.07.083.

355. Latrous El Atrache, L.; Ben Sghaier, R.; Bejaoui Kefi, B.; Haldys, V.; Dachraoui, M.; Tortajada, J. Factorial Design Optimization of Experimental Variables in Preconcentration of Carbamates Pesticides in Water Samples Using Solid Phase Extraction and Liquid Chromatography-Electrospray-Mass Spectrometry Determination. *Talanta* 2013, 117, 392–398, doi:10.1016/j.talanta.2013.09.032.
356. Nie, Y.; Qiang, Z.; Zhang, H.; Adams, C. Determination of Endocrine-Disrupting Chemicals in the Liquid and Solid Phases of Activated Sludge by Solid Phase Extraction and Gas Chromatography-Mass Spectrometry. *J Chromatogr A* 2009, 1216, 7071–7080, doi:10.1016/j.chroma.2009.08.064.
357. Zang, X.; Chang, Q.; Hou, F.; Zhang, S.; Wang, C.; Wang, Z.; Xu, J. Hydroxyl and Carboxyl Group Functionalized Conjugated Microporous Nanomaterial as Adsorbent for the Solid-Phase Extraction of Phenolic Endocrine Disrupting Chemicals from Freshwater Fish Samples. *Food Chem* 2024, 436, 137674, doi:10.1016/j.foodchem.2023.137674.
358. Moid AlAmmari, A.; Rizwan Khan, M.; Aqel, A. Trace Identification of Endocrine-Disrupting Bisphenol A in Drinking Water by Solid-Phase Extraction and Ultra-Performance Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry. *J King Saud Univ Sci* 2020, 32, 1634–1640, doi:10.1016/j.jksus.2019.12.022.
359. Wang, Y.; Li, G.; Zhu, Q.; Liao, C. A Multi-Residue Method for Determination of 36 Endocrine Disrupting Chemicals in Human Serum with a Simple Extraction Procedure in Combination of UPLC-MS/MS Analysis. *Talanta* 2019, 205, 120144, doi:10.1016/j.talanta.2019.120144.
360. Li, Y.; Yang, L.; Zhen, H.; Chen, X.; Sheng, M.; Li, K.; Xue, W.; Zhao, H.; Meng, S.; Cao, G. Determination of Estrogens and Estrogen Mimics by Solid-Phase Extraction with Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* 2021, 1168, 122559, doi:10.1016/j.jchromb.2021.122559.
361. Liu, R.; Zhou, J.L.; Wilding, A. Simultaneous Determination of Endocrine Disrupting Phenolic Compounds and Steroids in Water by Solid-Phase Extraction-Gas Chromatography-Mass Spectrometry. *J Chromatogr A* 2004, 1022, 179–189, doi:10.1016/j.chroma.2003.09.035.
362. Ru, I.T.K.; Sung, Y.Y.; Jusoh, M.; Wahid, M.E.A.; Nagappan, T. *Chlorella Vulgaris*: A Perspective on Its Potential for Combining High Biomass with High Value Bioproducts. *Appl Phycol* 2020, 1, 2–11, doi:10.1080/26388081.2020.1715256.

363. Xin, L.; Hong-ying, H.; Ke, G.; Jia, Y. Growth and Nutrient Removal Properties of a Freshwater Microalga *Scenedesmus* Sp. LX1 under Different Kinds of Nitrogen Sources. *Ecol Eng* 2010, 36, 379–381, doi:10.1016/j.ecoleng.2009.11.003.
364. Yang, Q.; Xu, W.; Luan, T.; Pan, T.; Yang, L.; Lin, L. Comparative Responses of Cell Growth and Related Extracellular Polymeric Substances in *Tetraselmis* Sp. to Nonylphenol, Bisphenol A and 17 $\alpha$ -Ethinylestradiol. *Environmental Pollution* 2021, 274, doi:10.1016/j.envpol.2021.116605.
365. Goldman, J.C.; Dennett, M.R.; Riley, C.B. Effect of Nitrogen-mediated Changes in Alkalinity on PH Control and CO<sub>2</sub> Supply in Intensive Microalgal Cultures. *Biotechnol Bioeng* 1982, 24, 619–631, doi:10.1002/bit.260240308.
366. Vinod R. Maraskolhe Carbon Sequestration Potential of *Scenedesmus* Species (Microalgae) under the Fresh Water Ecosystem. *Afr J Agr Res* 2012, 7, 2818–2823, doi:10.5897/ajar11.2196.
367. Cao, P.; Pan, X.; Su, X.; Liu, Z.; Li, M. Assembly of Eukaryotic Photosystem II with Diverse Light-Harvesting Antennas. *Curr Opin Struct Biol* 2020, 63, 49–57, doi:10.1016/j.sbi.2020.03.007.
368. Bakuei, N.; Amini, G.; Najafpour, G.D.; Jahanshahi, M.; Mohammadi, M. Optimal Cultivation of *Scenedesmus* Sp. Microalgae in a Bubble Column Photobioreactor. *Indian J Chem Technol* 2015, 22, 20–25, doi:10.56042/ijct.v22i1-2.4260.
369. Makareviciene, Prof.Dr.V.; Andrulevičiūtė, V.; Skorupskaitė, V.; Kasperovičienė, J. Cultivation of Microalgae *Chlorella* Sp. and *Scenedesmus* Sp. as a Potential Biofuel Feedstock. *Environmental Research, Engineering and Management* 2011, 57.
370. García, J.; Green, B.F.; Lundquist, T.; Mujeriego, R.; Hernández-Mariné, M.; Oswald, W.J. Long Term Diurnal Variations in Contaminant Removal in High Rate Ponds Treating Urban Wastewater. *Bioresour Technol* 2006, 97, 1709–1715, doi:10.1016/j.biortech.2005.07.019.
371. Garcia-Moscoso, J.L.; Obeid, W.; Kumar, S.; Hatcher, P.G. Flash Hydrolysis of Microalgae (*Scenedesmus* Sp.) for Protein Extraction and Production of Biofuels Intermediates. *J. Supercrit. Fluids* 2013, 82, 183–190, doi:10.1016/j.supflu.2013.07.012.
372. Agustini, N.W.S.; Hidhayati, N.; Wibisono, S.A. Effect of Hydrolysis Time and Acid Concentration on Bioethanol Production of Microalga *Scenedesmus* Sp. In Proceedings of the IOP Conference Series: Earth and Environmental Science; 2019; Vol. 308.

373. Ishaq, A.G.; Matias-Peralta, H.M.; Basri, H. Bioactive Compounds from Green Microalga *Scenedesmus* and Its Potential Applications: A Brief Review. *Pertanika J Trop Agric Sci* 2016, 39, 1–15.
374. Mendes, A.R.; Spínola, M.P.; Lordelo, M.; Prates, J.A.M. Chemical Compounds, Bioactivities, and Applications of *Chlorella Vulgaris* in Food, Feed and Medicine. *Applied Sciences* 2024, 14, 10810, doi:10.3390/app142310810.
375. Safi, C.; Zebib, B.; Merah, O.; Pontalier, P.Y.; Vaca-Garcia, C. Morphology, Composition, Production, Processing and Applications of *Chlorella Vulgaris*: A Review. *Renew. Sustain. Energy Rev.* 2014, 35, 265–278, doi:10.1016/j.rser.2014.04.007.
376. Noreen, A.; Mahmood, S.; Aziz, I.; Takriff, M.S.; Gulzar, S.; Ditta, A.; Khalid, A.; Mahmood, T. Microalgae as Potential Protein Sources: Evidence from Protein Extraction and Amino Acid Profiling of *Chlorella Vulgaris* and *Scenedesmus* Sp. *Pak J Agric Sci* 2021, 58, doi:10.21162/PAKJAS/21.511.
377. Sanyal, D.; Kodgire, S.; Desai, D.; Saxena, N.; Singh, S.; Dasgupta, S. Commitment for a Cleaner India: Utilization of CO<sub>2</sub> and Sewage Wastewater by Green Algae *Scenedesmus* Sp. Under Laboratory Conditions. In *Proceedings of the Smart Innovation, Systems and Technologies*; 2020; Vol. 161.
378. Raheem, A.; Sivasangar, S.; Wan Azlina, W.A.K.G.; Taufiq Yap, Y.H.; Danquah, M.K.; Harun, R. Thermogravimetric Study of *Chlorella Vulgaris* for Syngas Production. *Algal Res* 2015, 12, 52–59, doi:10.1016/j.algal.2015.08.003.
379. Ndikubwimana, T.; Zeng, X.; He, N.; Xiao, Z.; Xie, Y.; Chang, J.S.; Lin, L.; Lu, Y. Microalgae Biomass Harvesting by Bioflocculation-Interpretation by Classical DLVO Theory. *Biochem Eng J* 2015, 101, 160–167, doi:10.1016/j.bej.2015.05.010.
380. Li, N.; Wang, P.; Wang, S.; Wang, C.; Zhou, H.; Kapur, S.; Zhang, J.; Song, Y. Electrostatic Charges on Microalgae Surface: Mechanism and Applications. *J Environ Chem Eng* 2022, 10, 107516, doi:10.1016/j.jece.2022.107516.
381. Xin, L.; Hong-ying, H.; Ke, G.; Ying-xue, S. Effects of Different Nitrogen and Phosphorus Concentrations on the Growth, Nutrient Uptake, and Lipid Accumulation of a Freshwater Microalga *Scenedesmus* Sp. *Bioresour Technol* 2010, 101, 5494–5500, doi:10.1016/j.biortech.2010.02.016.
382. Wu, Y.H.; Yu, Y.; Li, X.; Hu, H.Y.; Su, Z.F. Biomass Production of a *Scenedesmus* Sp. under Phosphorous-Starvation Cultivation Condition. *Bioresour Technol* 2012, 112, 193–198, doi:10.1016/j.biortech.2012.02.037.

383. Kim, S.; Lee, Y.; Hwang, S.J. Removal of Nitrogen and Phosphorus by *Chlorella Sorokiniana* Cultured Heterotrophically in Ammonia and Nitrate. *Int Biodeterior Biodegradation* 2013, 85, 511–516, doi:10.1016/j.ibiod.2013.05.025.
384. Dębowski, M.; Rusanowska, P.; Zieliński, M.; Dudek, M.; Romanowska-Duda, Z. Biomass Production and Nutrient Removal by *Chlorella Vulgaris* from Anaerobic Digestion Effluents. *Energies (Basel)* 2018, 11, 1654, doi:10.3390/en11071654.
385. Silambarasan, S.; Logeswari, P.; Sivaramakrishnan, R.; Incharoensakdi, A.; Kamaraj, B.; Cornejo, P. *Scenedesmus* Sp. Strain SD07 Cultivation in Municipal Wastewater for Pollutant Removal and Production of Lipid and Exopolysaccharides. *Environ Res* 2023, 218, 115051, doi:10.1016/j.envres.2022.115051.
386. Pham, T.L.; Bui, M.H. Removal of Nutrients from Fertilizer Plant Wastewater Using *Scenedesmus* Sp.: Formation of Biofloculation and Enhancement of Removal Efficiency. *J Chem* 2020, 2020, 8094272, doi:10.1155/2020/8094272.
387. Wang, Y.; Guo, W.; Yen, H.W.; Ho, S.H.; Lo, Y.C.; Cheng, C.L.; Ren, N.; Chang, J.S. Cultivation of *Chlorella Vulgaris* JSC-6 with Swine Wastewater for Simultaneous Nutrient/COD Removal and Carbohydrate Production. *Bioresour Technol* 2015, 198, 619–625, doi:10.1016/j.biortech.2015.09.067.
388. Wu, Y.H.; Li, X.; Yu, Y.; Hu, H.Y.; Zhang, T.Y.; Li, F.M. An Integrated Microalgal Growth Model and Its Application to Optimize the Biomass Production of *Scenedesmus* Sp. LX1 in Open Pond under the Nutrient Level of Domestic Secondary Effluent. *Bioresour Technol* 2013, 144, 445–451, doi:10.1016/j.biortech.2013.06.065.
389. Kim, J.; Liu, Z.; Lee, J.Y.; Lu, T. Removal of Nitrogen and Phosphorus from Municipal Wastewater Effluent Using *Chlorella Vulgaris* and Its Growth Kinetics. *Desalination Water Treat* 2013, 51, 7800–7806, doi:10.1080/19443994.2013.779938.
390. Zhou, G.J.; Ying, G.G.; Liu, S.; Zhou, L.J.; Chen, Z.F.; Peng, F.Q. Simultaneous Removal of Inorganic and Organic Compounds in Wastewater by Freshwater Green Microalgae. *Environ Sci Process Impacts* 2014, 16, 2018–2027, doi:10.1039/c4em00094c.
391. Wang, N.; He, L.; Sun, X.; Li, X.; Li, M. The Transformation of Benzophenone-3 in Natural Waters and AOPs: The Roles of Reactive Oxygen Species and Potential Environmental Risks of Products. *J Hazard Mater* 2022, 427, 127941, doi:10.1016/j.jhazmat.2021.127941.

392. Chen, D.Y.; Guo, X.F.; Wang, H.; Zhang, H.S. The Natural Degradation of Benzophenone at Low Concentration in Aquatic Environments. *Water Sci Technol* 2015, 72, 503–509, doi:10.2166/wst.2015.221.
393. Ji, M.K.; Kabra, A.N.; Choi, J.; Hwang, J.H.; Kim, J.R.; Abou-Shanab, R.A.I.; Oh, Y.K.; Jeon, B.H. Biodegradation of Bisphenol A by the Freshwater Microalgae *Chlamydomonas Mexicana* and *Chlorella Vulgaris*. *Ecol Eng* 2014, 73, 260–269, doi:10.1016/j.ecoleng.2014.09.070.
394. Abargues, M.R.; Ferrer, J.; Bouzas, A.; Seco, A. Removal and Fate of Endocrine Disruptors Chemicals under Lab-Scale Posttreatment Stage. Removal Assessment Using Light, Oxygen and Microalgae. *Bioresour Technol* 2013, 149, 142–148, doi:10.1016/j.biortech.2013.09.051.
395. Li, R.; Chen, G.Z.; Tam, N.F.Y.; Luan, T.G.; Shin, P.K.S.; Cheung, S.G.; Liu, Y. Toxicity of Bisphenol A and Its Bioaccumulation and Removal by a Marine Microalga *Stephanodiscus Hantzschii*. *Ecotoxicol Environ Saf* 2009, 72, 321–328, doi:10.1016/j.ecoenv.2008.05.012.
396. Tenorio, R.; Fedders, A.C.; Strathmann, T.J.; Guest, J.S. Impact of Growth Phases on Photochemically Produced Reactive Species in the Extracellular Matrix of Algal Cultivation Systems. *Environ Sci (Camb)* 2017, 3, 1095–1108, doi:10.1039/c7ew00172j.
397. Wu, P.H.; Yeh, H.Y.; Chou, P.H.; Hsiao, W.W.; Yu, C.P. Algal Extracellular Organic Matter Mediated Photocatalytic Degradation of Estrogens. *Ecotoxicol Environ Saf* 2021, 209, 111818, doi:10.1016/j.ecoenv.2020.111818.
398. Wang, Y.; Sun, Q.; Li, Y.; Wang, H.; Wu, K.; Yu, C.P. Biotransformation of Estrone, 17 $\beta$ -Estradiol and 17 $\alpha$ -Ethinylestradiol by Four Species of Microalgae. *Ecotoxicol Environ Saf* 2019, 180, 723–732, doi:10.1016/j.ecoenv.2019.05.061.
399. Ruas, G.; López-Serna, R.; Scarcelli, P.G.; Serejo, M.L.; Boncz, M.Á.; Muñoz, R. Influence of the Hydraulic Retention Time on the Removal of Emerging Contaminants in an Anoxic-Aerobic Algal-Bacterial Photobioreactor Coupled with Anaerobic Digestion. *Sci Total Environ* 2022, 827, 154262, doi:10.1016/j.scitotenv.2022.154262.
400. Song, C.; Hu, H.; Ao, H.; Wu, Y.; Wu, C. Removal of Parabens and Their Chlorinated By-Products by Periphyton: Influence of Light and Temperature. *Environmental Science and Pollution Research* 2017, 24, 5566–5575, doi:10.1007/s11356-016-8301-x.
401. Lee, S.H.; Xiong, J.Q.; Ru, S.; Patil, S.M.; Kurade, M.B.; Govindwar, S.P.; Oh, S.E.; Jeon, B.H. Toxicity of Benzophenone-3 and Its Biodegradation in a Freshwater

- Microalga *Scenedesmus Obliquus*. *J Hazard Mater* 2020, 389, 122149, doi:10.1016/j.jhazmat.2020.122149.
402. Mao, F.; He, Y.; Kushmaro, A.; Gin, K.Y.H. Effects of Benzophenone-3 on the Green Alga *Chlamydomonas Reinhardtii* and the Cyanobacterium *Microcystis Aeruginosa*. *Aquat Toxicol* 2017, 193, 1–8, doi:10.1016/j.aquatox.2017.09.029.
  403. Huang, Y.; Luo, L.; Ma, X.Y.; Wang, X.C. Effect of Elevated Benzophenone-4 (BP4) Concentration on *Chlorella Vulgaris* Growth and Cellular Metabolisms. *Environ Sci Pollut Res* 2018, 25, 32549–32561, doi:10.1007/s11356-018-3171-z.
  404. Pavia, D.L.; Lampman, G.M.; Kriz, G.S. Introduction to Spectroscopy Third Edition. *Thomson Learning, Inc.* 2001.
  405. Pratiwi, R.A.; Nandiyanto, A.B.D. How to Read and Interpret UV-VIS Spectrophotometric Results in Determining the Structure of Chemical Compounds. *Indonesian J. Educ. Res. Technol.* 2022, 2, 1–20, doi:10.17509/ijert.v2i1.35171.
  406. Imamović, B.; Trebše, P.; Omeragić, E.; Bečić, E.; Pečet, A.; Dedić, M. Stability and Removal of Benzophenone-Type UV Filters from Water Matrices by Advanced Oxidation Processes. *Molecules* 2022, 27, 1874, doi:10.3390/molecules27061874.
  407. Du, E.; Li, J.; Zhou, S.; Li, M.; Liu, X.; Li, H. Insight into the Degradation of Two Benzophenone-Type UV Filters by the UV/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> Advanced Oxidation Process. *Water (Switzerland)* 2018, 10, 1238, doi:10.3390/w10091238.
  408. Zúñiga-Benítez, H.; Peñuela, G.A. Application of Solar Photo-Fenton for Benzophenone-Type UV Filters Removal. *J Environ Manage* 2018, 217, 929–938, doi:10.1016/j.jenvman.2018.03.075.
  409. Bubev, E.; Georgiev, A.; Machkova, M. Kinetic Study on UV-Absorber Photodegradation under Different Conditions. *Chem Phys* 2016, 476, 69–79, doi:10.1016/j.chemphys.2016.08.004.
  410. He, D.; Zeng, Y.; Zhou, G. The Influence of Microplastics on the Toxic Effects and Biodegradation of Bisphenol A in the Microalgae *Chlorella Pyrenoidosa*. *Aquat Ecol* 2022, 56, doi:10.1007/s10452-022-09966-6.
  411. Wang, R.; Diao, P.; Chen, Q.; Wu, H.; Xu, N.; Duan, S. Identification of Novel Pathways for Biodegradation of Bisphenol A by the Green Alga *Desmodesmus Sp.WR1*, Combined with Mechanistic Analysis at the Transcriptome Level. *Chem. Eng. J.* 2017, 321, 424–431, doi:10.1016/j.cej.2017.03.121.

412. Eltoukhy, A.; Jia, Y.; Lamraoui, I.; Abo-Kadoun, M.A.; Atta, O.M.; Nahurira, R.; Wang, J.; Yan, Y. Transcriptome Analysis and Cytochrome P450 Monooxygenase Reveal the Molecular Mechanism of Bisphenol A Degradation by *Pseudomonas Putida* Strain YC-AE1. *BMC Microbiol* 2022, 22, 294, doi:10.1186/s12866-022-02689-6.
413. Trabert, B.; Brinton, L.A.; Anderson, G.L.; Pfeiffer, R.M.; Falk, R.T.; Strickler, H.D.; Sliesoraitis, S.; Kuller, L.H.; Gass, M.L.; Fuhrman, B.J.; et al. Circulating Estrogens and Postmenopausal Ovarian Cancer Risk in the Women's Health Initiative Observational Study. *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.* 2016, 25, 648–656, doi:10.1158/1055-9965.EPI-15-1272-T.
414. Ibero, J.; Galán, B.; Rivero-Buceta, V.; García, J.L. Unraveling the 17 $\beta$ -Estradiol Degradation Pathway in *Novosphingobium Tardaugens* NBRC 16725. *Front Microbiol* 2020, 11, 588300, doi:10.3389/fmicb.2020.588300.
415. Ge, L.; Deng, H.; Wu, F.; Deng, N. Microalgae-Promoted Photodegradation of Two Endocrine Disrupters in Aqueous Solutions. *J. Chem. Technol. Biotechnol.* 2009, 84, 331–336, doi:10.1002/jctb.2043.
416. Sutherland, D.L.; Ralph, P.J. Microalgal Bioremediation of Emerging Contaminants - Opportunities and Challenges. *Water Res* 2019, 164, 114921, doi:10.1016/j.watres.2019.114921.
417. Ben Ouada, S.; Ben Ali, R.; Leboulanger, C.; Ben Ouada, H.; Sayadi, S. Effect of Bisphenol A on the Extremophilic Microalgal Strain *Picocystis* Sp. (Chlorophyta) and Its High BPA Removal Ability. *Ecotoxicol Environ Saf* 2018, 158, 1–8, doi:10.1016/j.ecoenv.2018.04.008.
418. Alzate, M.E.; Muñoz, R.; Rogalla, F.; Fdz-Polanco, F.; Pérez-Elvira, S.I. Biochemical Methane Potential of Microalgae: Influence of Substrate to Inoculum Ratio, Biomass Concentration and Pretreatment. *Bioresour Technol* 2012, 123, 488–494, doi:10.1016/j.biortech.2012.06.113.
419. Keymer, P.; Ruffell, I.; Pratt, S.; Lant, P. High Pressure Thermal Hydrolysis as Pre-Treatment to Increase the Methane Yield during Anaerobic Digestion of Microalgae. *Bioresour Technol* 2013, 131, 128–133, doi:10.1016/j.biortech.2012.12.125.
420. González-Fernández, C.; Sialve, B.; Bernet, N.; Steyer, J.P. Comparison of Ultrasound and Thermal Pretreatment of *Scenedesmus* Biomass on Methane Production. *Bioresour Technol* 2012, 110, 610–616, doi:10.1016/j.biortech.2012.01.043.

421. González-Fernández, C.; Sialve, B.; Bernet, N.; Steyer, J.P. Thermal Pretreatment to Improve Methane Production of *Scenedesmus* Biomass. *Biomass Bioenergy* 2012, *40*, 105–111, doi:10.1016/j.biombioe.2012.02.008.
422. Sialve, B.; Bernet, N.; Bernard, O. Anaerobic Digestion of Microalgae as a Necessary Step to Make Microalgal Biodiesel Sustainable. *Biotechnol Adv* 2009, *27*, 409–416, doi:10.1016/j.biotechadv.2009.03.001.
423. Fermoso, F.G.; Beltran, C.; Jimenez, A.; Fernández, M.J.; Rincón, B.; Borja, R.; Jeison, D. Screening of Biomethane Production Potential from Dominant Microalgae. *J Environ Sci Health A Tox Hazard Subst Environ Eng* 2016, *51*, 1062–1067, doi:10.1080/10934529.2016.1198627.
424. Lakaniemi, A.M.; Hulatt, C.J.; Thomas, D.N.; Tuovinen, O.H.; Puhakka, J.A. Biogenic Hydrogen and Methane Production from *Chlorella Vulgaris* and *Dunaliella Tertiolecta* Biomass. *Biotechnol Biofuels* 2011, *4*, 1–12, doi:10.1186/1754-6834-4-34.
425. Xiao, C.; Liao, Q.; Fu, Q.; Huang, Y.; Chen, H.; Zhang, H.; Xia, A.; Zhu, X.; Reungsang, A.; Liu, Z. A Solar-Driven Continuous Hydrothermal Pretreatment System for Biomethane Production from Microalgae Biomass. *Appl Energy* 2019, *236*, 1011–1018, doi:10.1016/j.apenergy.2018.12.014.
426. Saleem, S.; Ullah, Z.; Rashid, N.; Sheikh, Z. Effect of Hydrothermal Pretreatment on Leachate Fed *Scenedesmus* Sp. Biomass Solubilization and Biogas Production. *J Environ Manage* 2024, *365*, 121515, doi:10.1016/j.jenvman.2024.121515.
427. Mendez, L.; Mahdy, A.; Ballesteros, M.; González-Fernández, C. *Chlorella Vulgaris* vs Cyanobacterial Biomasses: Comparison in Terms of Biomass Productivity and Biogas Yield. *Energy Convers Manag* 2015, *92*, 137–142, doi:10.1016/j.enconman.2014.11.050.
428. Guo, Y.; Xiao, F.; Yan, M.; Tang, S.; Duan, Z.; Sun, Y.; Li, Y. Effect of Ammonia on Anaerobic Digestion: Focusing on Energy Flow and Electron Transfer. *Chem. Eng. J.* 2023, *471*, 144638, doi:10.1016/j.cej.2023.144638.
429. Jiang, Y.; McAdam, E.; Zhang, Y.; Heaven, S.; Banks, C.; Longhurst, P. Ammonia Inhibition and Toxicity in Anaerobic Digestion: A Critical Review. *J. Water Process Eng.* 2019, *32*, 100899, doi:10.1016/j.jwpe.2019.100899.
430. Yellezuome, D.; Zhu, X.; Wang, Z.; Liu, R. Mitigation of Ammonia Inhibition in Anaerobic Digestion of Nitrogen-Rich Substrates for Biogas Production by Ammonia Stripping: A Review. *Renew. Sustain. Energy Rev.* 2022, *157*, 112043, doi:10.1016/j.rser.2021.112043.

431. Hussain, A.; Kumar, P.; Mehrotra, I. Nitrogen and Phosphorus Requirement in Anaerobic Process: A Review. *Environ Eng Manag J* 2015, 14, 112043, doi:10.30638/eemj.2015.086.
432. Diaz, O.A.; Reddy, K.R.; Moore, P.A. Solubility of Inorganic Phosphorus in Stream Water as Influenced by PH and Calcium Concentration. *Water Res* 1994, 28, 1755–1763, doi:10.1016/0043-1354(94)90248-8.
433. Jamali-Behnam, F.; Bello-Mendoza, R.; Wareham, D.; Masten, S. Effect of Nutrient Imbalance on Performance Efficiency of an Anaerobic Baffled Reactor and the Production of Membrane Fouling Compounds. *Water Science and Technology* 2024, 90, 2251–2265, doi:10.2166/wst.2024.338.
434. Zhou, Q.; Sun, H.; Jia, L.; Wu, W.; Wang, J. Simultaneous Biological Removal of Nitrogen and Phosphorus from Secondary Effluent of Wastewater Treatment Plants by Advanced Treatment: A Review. *Chemosphere* 2022, 296, 134054, doi:10.1016/j.chemosphere.2022.134054.
435. Westgate, P.J.; Park, C. Evaluation of Proteins and Organic Nitrogen in Wastewater Treatment Effluents. *Environ Sci Technol* 2010, 44, 5352–5357, doi:10.1021/es100244s.
436. Li, C.; Ma, J.; Shen, J.; Wang, P. Removal of Phosphate from Secondary Effluent with Fe<sup>2+</sup> Enhanced by H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> at Nature PH/Neutral PH. *J Hazard Mater* 2009, 166, 891–896, doi:10.1016/j.jhazmat.2008.11.111.
437. Lee, S.; Ihara, M.; Yamashita, N.; Tanaka, H. Improvement of Virus Removal by Pilot-Scale Coagulation-Ultrafiltration Process for Wastewater Reclamation: Effect of Optimization of PH in Secondary Effluent. *Water Res* 2017, 114, 23–30, doi:10.1016/j.watres.2017.02.017.
438. Arbib, Z.; Ruiz, J.; Álvarez-Díaz, P.; Garrido-Pérez, C.; Barragan, J.; Perales, J.A. Photobiotreatment: Influence of Nitrogen and Phosphorus Ratio in Wastewater on Growth Kinetics of *Scenedesmus Obliquus*. *Int J Phytoremediation* 2013, 15, 774–788, doi:10.1080/15226514.2012.735291.
439. Kozlova, T.A.; Hardy, B.P.; Levin, D.B. Effect of Fish Steroids 17 $\beta$ -Estradiol and 17,20 $\beta$ -Dihydroxy-4-Pregnen-3-One on Growth, Accumulation of Pigments, and Fatty Acid Profiles in the Microalgae *Scenedesmus Quadricauda* (CPCC-158). *Renew Energy* 2020, 148, 798–806, doi:10.1016/j.renene.2019.10.165.
440. Ye, S.; Gao, L.; Zhao, J.; An, M.; Wu, H.; Li, M. Simultaneous Wastewater Treatment and Lipid Production by *Scenedesmus* Sp. HXY2. *Bioresour Technol* 2020, 302, 122903, doi:10.1016/j.biortech.2020.122903.

441. Mohy El-Din, S.M. Effects of Environmental Pollutants on the Growth Characteristics, Oxidative Stress and Biochemical Composition of *Nannochloropsis Salina* for Biodiesel Production. *Iran J Sci Technol Trans A Sci* 2020, 44, 629–640, doi:10.1007/s40995-020-00881-9.
442. Habibi, A.; Nematzadeh, G.A.; shariati, F.P.; Amrei, H.D.; Teymouri, A. Effect of Light/Dark Cycle on Nitrate and Phosphate Removal from Synthetic Wastewater Based on BG11 Medium by *Scenedesmus* Sp. *3 Biotech* 2019, 9, 1–9, doi:10.1007/s13205-019-1679-7.
443. Nordin, N.; Yusof, N.; Samsudin, S. Biomass Production of *Chlorella* Sp., *Scenedesmus* Sp., and *Oscillatoria* Sp. in Nitrified Landfill Leachate. *Waste Biomass Valorization* 2017, 8, 2301–2311, doi:10.1007/s12649-016-9709-8.
444. da Fontoura, J.T.; Rolim, G.S.; Farenzena, M.; Gutterres, M. Influence of Light Intensity and Tannery Wastewater Concentration on Biomass Production and Nutrient Removal by Microalgae *Scenedesmus* Sp. *Process Saf. Environ. Prot.* 2017, 111, 355–362, doi:10.1016/j.psep.2017.07.024.
445. Argenta, T.S.; Barros, A.R.M.; de Carvalho, C. de A.; dos Santos, A.B.; Firmino, P.I.M. Parabens in Aerobic Granular Sludge Systems: Impacts on Granulation and Insights into Removal Mechanisms. *Sci Total Environ* 2021, 753, 142105, doi:10.1016/j.scitotenv.2020.142105.
446. Sami, N.; Afzal, B.; Rehmanji, M.; Naaz, H.; Yasin, D.; Jutur, P.P.; Fatma, T. Insight into the Mechanism of Estrone Biodegradation by *Spirulina* CPCC-695. *Environ Dev Sustain* 2023, 27, 739–764, doi:10.1007/s10668-023-03873-y.



**07**

**ANEXOS**



## 7. Anexos

### 7.1. Calibrados CDEs

Se establecieron tres curvas de calibrado para cuantificar los CDEs en las muestras en función del rango de concentraciones. Primero, una curva de calibrado genérica para concentraciones entre 15 y 0,375 ppm, obtenida a partir de muestras extraídas mediante el método de SPE desarrollado. Después, una segunda curva de calibrado para concentraciones entre 375 ppb y el ILOQ, representada como el área en función de la concentración y, finalmente, una curva de calibrado entre el ILOQ y el LOQ, expresada como la altura de pico en función de la concentración. Todas las curvas de calibrado se recogen en la Tabla 7 - 1.

*Tabla 7 - 1. Curvas de calibrado (a es la pendiente y b la ordenada en el origen), valores de  $R^2$  e intervalos de concentraciones de trabajo.*

| CDE | a       | b       | $R^2$ | Rango        |
|-----|---------|---------|-------|--------------|
| MeP | 15,659  | 8,411   | 0,933 | 15-0,375 ppm |
|     | 0,053   | -0,582  | 0,994 | 375-120 ppb  |
|     | 0,009   | -0,049  | 0,992 | 120-25 ppb   |
| PrP | 110,188 | -19,207 | 0,998 | 15-0,375 ppm |
|     | 0,079   | 0,044   | 0,996 | 375-110 ppb  |
|     | 0,009   | -0,017  | 0,996 | 110-33 ppb   |
| BuP | 115,763 | 9,925   | 0,997 | 15-0,375 ppm |
|     | 0,082   | 1,194   | 0,998 | 375-150 ppb  |
|     | 0,006   | 0,229   | 0,978 | 150-100 ppb  |
| BP  | 161,541 | 4,705   | 0,997 | 15-0,375 ppm |
|     | 0,087   | 1,408   | 0,985 | 375-230 ppb  |
|     | 0,005   | -0,009  | 0,996 | 230-80 ppb   |
| BPA | 88,791  | 3,401   | 0,995 | 15-0,375 ppm |
|     | 0,093   | -2,343  | 0,991 | 375-110 ppb  |
|     | 0,010   | -0,013  | 0,995 | 110-70 ppb   |
| E   | 65,693  | -0,514  | 0,997 | 15-0,375 ppm |
|     | 0,072   | -5,563  | 0,986 | 375-230 ppb  |
|     | 0,004   | 0,030   | 0,989 | 230-100 ppb  |

## 7.2. Calibrados nutrientes

En la Figura 7 - 1 se presentan los calibrados empleados para cuantificar los diferentes nutrientes en las muestras.

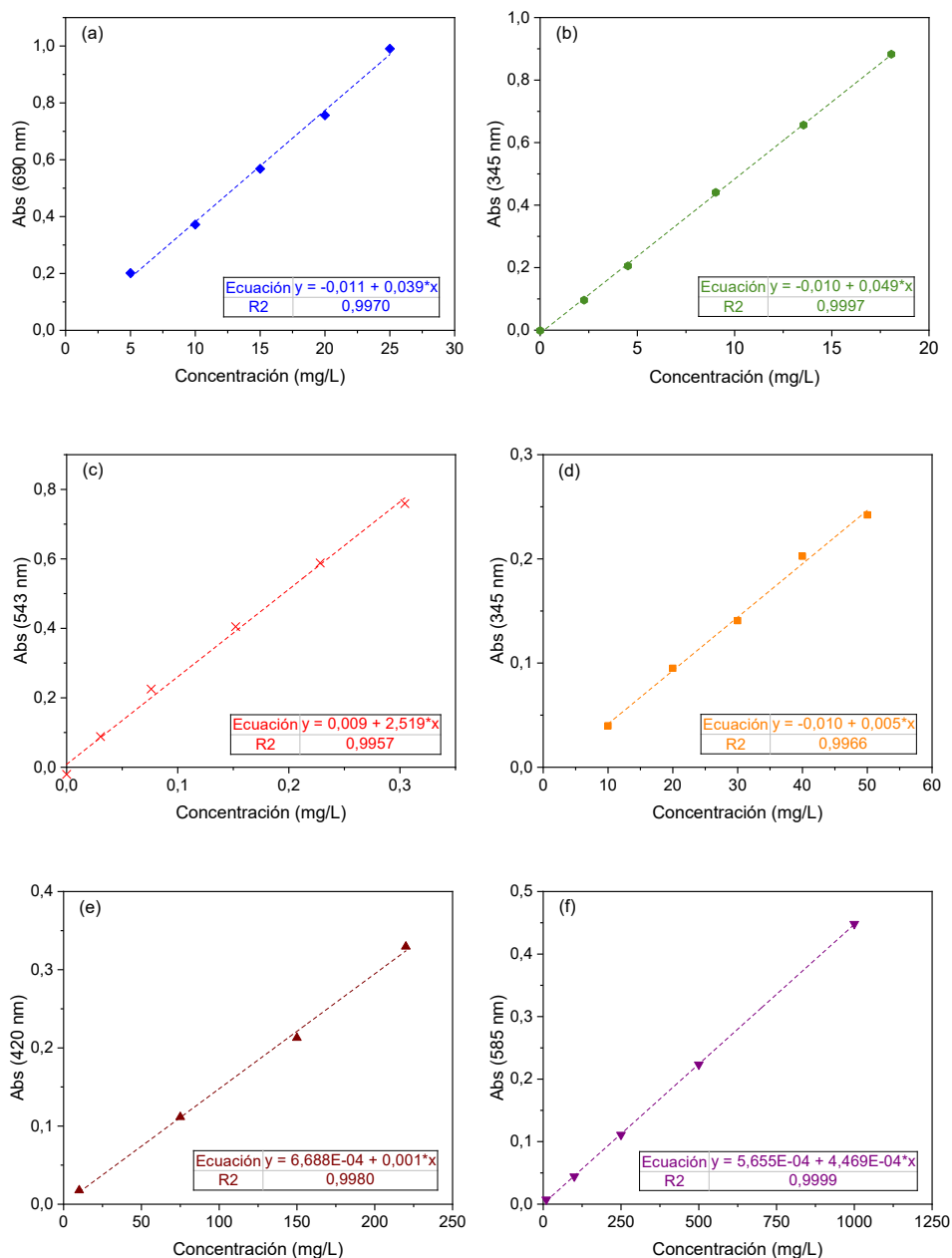


Figura 7 - 1. Calibrado para la cuantificación de (a) amonio, (b) nitratos, (c) nitritos, (d) nitrógeno total, (e) fosfatos y (f) DQO.



