

**Universidad
Autónoma
Metropolitana**



Casa abierta al tiempo **Azcapotzalco**

**“Estudio de la biodegradabilidad y ecotoxicidad de plásticos
oxodegradables de mayor uso en Colombia”**

TESIS

Para obtener el grado de

Doctora en Ciencias e Ingeniería Ambiental

PRESESENTA

Ms. C. CARMEN ALICIA ARIAS VILLAMIZAR

ASESORA

Dra. ALETHIA VÁZQUEZ MORILLAS

AGRADECIMIENTOS

Dra. Alethia Vázquez Morillas, por la asesoría de esta investigación.

Institucionales

CONACYT, por otorgar beca parcial para adelantar esta investigación.

Universidad del Norte (Colombia). Por facilitar el trabajo en los laboratorios de Química y biología, laboratorio de aguas y laboratorio de materiales.

Universidad del Atlántico (Colombia). Al laboratorio de biotecnología, específicamente al Profesor Edgardo Angulo.

Marinas de Colombia (Colombia). Al señor Javier Julvez por permitir la salvaguarda de mi muestreo en el mar.

Sociedad de Acueducto, Alcantarillado y Aseo de Barranquilla S.A. E.S.P. (Triple A) (Colombia). Ingeniero Claudio Rodríguez y su personal de apoyo, por facilitar y guardar celosamente las muestras.

Sinodales

Dra. Julia Aguilar Pliego

Dra. María Teresa Castañeda Briones

Dra. Rosa María Espinosa Valdemar

Dr. José Manuel Rojas García

Dra. Alethia Vázquez Morillas

Personales

Joachim Paul Hahn Von Hessberg. Decano de la Facultad de Ciencias Básicas de la Universidad del Norte, por facilitar mi trabajo dentro de las instalaciones de la universidad.

Dr. Luis Jesús Otero. Docente de la Universidad del Norte, mediador y consejero.

Javier Julvez. Marinas de Colombia. Por permitir el uso de sus instalaciones.

Personal de Marinas de Colombia. Por su ayuda constante

Estudio de la biodegradabilidad y ecotoxicidad de plásticos oxodegradables

Personal de laboratorio de Tecnologías Sustentables de la Universidad Autónoma Metropolitana, Azcapotzalco.

Ingeniera Ángela Sierra. Asesoría y apoyo en aspectos fisicoquímicos del agua.

Microbióloga Martha Ruidiaz y Yurina Gutiérrez, por su asesoría en las técnicas microbiológicas.

Ingenieros Giovanni Ramos y Jorge Villegas. Por el apoyo en el uso de software.

Al ingeniero Mauricio Yáñez Lino de Plásticos Degradables S.A. de C.V., por facilitar sus equipos de laboratorio.

Gladys Edith Martínez y María Mercado, por su soporte y amistad durante mi estancia en México.

DEDICATORIA

A la memoria eterna de mis padres.

A la prolongación de mi existencia representada en Fabian, Marcela, Diego, Claudia, Yaneth, Sareth, Sonia, Cristian, David, Santiago.

A Rafael: mi eterno compañero, amigo, consejero y soporte emocional. Gracias amor por tu comprensión y paciencia.

ÍNDICE

1 INTRODUCCIÓN.....	22
Antecedentes.....	22
2 JUSTIFICACIÓN	25
3 OBJETIVOS	28
3.1 Objetivo general	28
3.2 Objetivos específicos	28
4 HIPÓTESIS	30
5 MARCO TEÓRICO Y ANTECEDENTES	32
5.1 Los plásticos	32
5.1.1 Polietileno.....	34
Plásticos degradables y biodegradables.....	36
Plásticos oxodegradables	36
5.2 Degradación de plásticos	38
Efectos de la estructura.....	38
5.2.2 Factores abióticos.....	39
5.2.3 Factores bióticos.....	42
5.2.4 Técnicas analíticas para evaluación de la degradación de plásticos	44
5.2.5 Métodos estandarizados para evaluación de la biodegradación de plásticos	45
Procesos	48
5.3 Efectos de los plásticos en ambientes acuáticos.....	49
5.3.1 Plásticos como portadores de compuestos emergentes.....	50
5.3.2 Plásticos como vectores de microorganismos.....	51
5.3.3 Enredos e ingesta de plásticos.....	52
5.4 Ecotoxicidad	52
5.4.1 Evaluación de la ecotoxicidad.....	53
5.5 Microalgas en la ecotoxicología.....	57
5.5.1 Clasificación de las microalgas.....	57
Simbiosis con sistemas de arrecifes.	58
(Llorente y Cereceda, 2001)	58
5.5.2 Requerimientos para el desarrollo de las microalgas.....	58

Estudio de la biodegradabilidad y ecotoxicidad de plásticos oxodegradables

5.5.3 Chlorella sp	61
6 METODOLOGÍA	65
6.1 Selección, preparación y caracterización de materiales	66
6.1.1 Selección de muestras plásticas	66
6.1.2 Corte de las probetas	67
6.1.3 Caracterización inicial de las películas plásticas	67
6.1.4 Fotooxidación de los plásticos	70
6.2 Evaluación de la degradación de plásticos en ambientes naturales	71
6.2.1 Preparación de las trampas de exposición	71
6.2.2 Diseño experimental	72
6.2.3 Ubicación geográfica de los lugares de exposición	73
6.2.4 Exposición de muestras en agua salada	73
6.2.5 Exposición de muestras en agua dulce	74
6.2.6 Monitoreo de la calidad del agua	75
6.2.7 Evaluación de la degradación de plásticos	75
6.2.8 Microbiología de la biopelícula en los plásticos estudiados	76
6.3 Evaluación de biodegradación en ambiente controlado en laboratorio	78
6.3.1 Preparación de materiales	79
6.3.2 Diseño experimental	79
6.3.3 Construcción del sistema respirométrico	80
6.3.4 Evaluación de la biodegradación	83
6.4 Evaluación de ecotoxicidad	84
6.4.1 Acondicionamiento de las algas	84
6.4.2 Determinación de curva de crecimiento	86
6.4.3 Ensayos de ecotoxicidad de los plásticos	87
6.4.4 Técnicas analíticas para evaluar el crecimiento de la microalga	89
6.5 Análisis estadístico	89
7 Resultados	92
7.1 Caracterización de materiales	92
7.1.1 Caracterización inicial de las películas plásticas	92
7.1.2 Propiedades mecánicas iniciales de los plásticos	93
7.1.3 Caracterización química	95
7.2 Fotooxidación de los plásticos	96
7.3 Degradación de los plásticos ambientes naturales	98

Estudio de la biodegradabilidad y ecotoxicidad de plásticos oxodegradables	
7.3.1 Ambiente marino.....	98
7.3.2 Ambiente de agua dulce.....	118
7.3.3 Comparación de la degradación en los dos ambientes.....	132
7.4 Biodegradación en ambiente controlado de laboratorio	135
7.5 Evaluación de ecotoxicidad	137
7.5.1 Determinación de curva de crecimiento de la microalga <i>Chlorella</i> sp	137
7.5.2 Ensayos de toxicidad de los plásticos a diferentes concentraciones	139
7.5.3 Micrografías de las colonias de <i>Chlorella</i> sp durante su ciclo de vida.....	146
8 DISCUSIÓN.....	151
8.1 Materiales iniciales.....	151
8.2 Fotooxidación previa	152
8.3 Degradación en ambientes naturales, observación visual.....	155
8.4 Degradación en ambiente naturales, influencia de las características del medio	157
8.5 Degradación en ambientes naturales, medición del porcentaje de elongación.....	158
8.6 Degradación en ambientes naturales, índice de carbonilo.....	160
8.7 Degradación en ambientes naturales y la presencia de microorganismos.	161
8.8 Degradación en ambiente controlado de laboratorio.....	163
8.9 Degradación, consideraciones finales	164
8.10 Toxicidad	165
9 CONCLUSIONES	169
10 RECOMENDACIONES.....	173
REFERENCIAS.....	174

Estudio de la biodegradabilidad y ecotoxicidad de plásticos oxodegradables

ÍNDICE DE FIGURAS

<i>Figura 5.1 Demanda europea de plásticos por tipo de resina.</i>	33
<i>Figura 5.2 Micrografía del PEAD correspondiente a la morfología lamelar y estructura esquemática de los PEAD, PEBD, y PLBD.</i>	35
<i>Figura 5.3 Formación de radicales alcóxidos y peróxidos a partir de la descomposición de hidroperóxidos catalizadas por iones metálicos.</i>	37
<i>Figura 5.4 Mecanismo de degradación del PE.</i>	40
<i>Figura 5.5 Principales factores de interacción físicos y naturales en un ecosistema acuático.</i>	54
<i>Figura 6.1 Esquema general de las etapas experimentales de la investigación.</i>	66
<i>Figura 6.2 Micrómetro.</i>	68
<i>Figura 6.3 Máquina Universal, para prueba de elongación.</i>	69
<i>Figura 6.4 Cámara de intemperismo.</i>	71
<i>Figura 6.5 Trampas para exposición de los plásticos en ambientes naturales acuáticos.</i>	72
<i>Figura 6.6 Mapa del lugar de exposición de las probetas de plásticos en la Costa Caribe Colombiana.</i>	73
<i>Figura 6.7 Probetas flotantes sobre el agua marina en Puerto Velero (Atlántico, Colombia).</i>	74
<i>Figura 6.8 Probetas flotantes sobre el agua dulce del Río Magdalena (Barranquilla, Colombia).</i>	75
<i>Figura 6.9 Aparatos para evaluar biodegradación de PEAD convencional y oxodegradable con y sin fotooxidación, utilizando la norma ASTM D6691-17 como referente.</i>	81
<i>Figura 6.10 Reactor biológico para las pruebas respirométricas.</i>	81
<i>Figura 6.11 Esquema del equipo de medición de biodegradación en condiciones controladas.</i>	83
<i>Figura 6.12 Reactores de crecimiento de la microalga <i>Chlorella sp.</i></i>	87
<i>Figura 6.13 Sistema de biorreactores de prueba para evaluar ecotoxicidad de los plásticos utilizando <i>Chlorella sp.</i> como organismo de prueba.</i>	88
<i>Figura 7.1 Distribución de probabilidad de los valores de porcentaje de elongación para</i>	94
<i>Figura 7.2 Distribución de probabilidad de los valores de porcentaje de elongación para</i>	94
<i>Figura 7.3 Variación de la elongación a la ruptura en función del tiempo de la fotooxidación de PEAD convencional y oxodegradable.</i>	97
<i>Figura 7.4 Fotografías de los plásticos sin tratamiento: (A) PEAD convencional, (B) PEAD oxodegradable.</i>	100
<i>Figura 7.5 Registro fotográfico de PEAD convencional expuesto en ambiente marino, (A) sin exposición, (B) 30 días, (C) 180 días.</i>	100
<i>Figura 7.6 Registro fotográfico de PEAD convencional fotooxidado: (A) sin exposición; expuesto en ambiente marino: (B) 30 días, (C) 180 días.</i>	100
<i>Figura 7.7 Registro fotográfico de PEAD oxodegradable: (A) sin exposición; expuesto en ambiente marino: (B) 30 días, (C) 180 días.</i>	101
<i>Figura 7.8 Registro fotográfico de PEAD oxodegradable fotooxidado: (A) sin exposición; expuesto en ambiente marino, (B) 30 días, (C) 150 días.</i>	102

Estudio de la biodegradabilidad y ecotoxicidad de plásticos oxodegradables

<i>Figura 7.9 Micrografía de los plásticos originales: (A) PEAD convencional sin pigmento, (B) PEAD oxodegradable con y sin pigmento, (C) PEAD convencional pigmentado.....</i>	102
<i>Figura 7.10 Registro micro fotográfico de PEAD convencional: (A) sin exposición; expuesto 180 días en el mar: (B) sin afectación observable; (C) con afectación observable.....</i>	103
<i>Figura 7.11 Registro micro fotográfico de PEAD convencional fotooxidado: (A) sin exposición; expuesto 180 días: (B) sin afectación observable; (C) con afectación observable.....</i>	103
<i>Figura 7.12 Registro micro fotográfico de PEAD oxodegradable: (A) sin exposición; expuesto 180 días: (B) sin afectación observable; (C) con afectación observable.....</i>	103
<i>Figura 7.13 Registro micro fotográfico de PEAD oxodegradable fotooxidado: (A) sin exposición; expuesto 180 días: (B) sin afectación observable; (C) con afectación observable.....</i>	104
<i>Figura 7.14 Líneas de tendencia de las mediciones de porcentaje de elongación para las muestras expuestas en ambiente de agua marina durante 180 días.....</i>	105
<i>Figura 7.15 Fotografía y microfotografía de la biopelícula sobre plásticos expuestos 180 días en ambiente marino (A) PEAD convencional, (B) PEAD oxodegradable.....</i>	106
<i>Figura 7.16 Espectros FTIR: (A) PEAD oxodegradable; (B) PEAD oxodegradable fotooxidado inicial; (C) PEAD oxodegradable fotooxidado expuesto 60 días en ambiente marino natural.....</i>	109
<i>Figura 7.17 IC en función del tiempo para los diferentes plásticos expuestos en ambiente marino.....</i>	110
<i>Figura 7.18 Colonización de las trampas de exposición de los plásticos en el medio marino natural.....</i>	111
<i>Figura 7.19 Cultivo en agar marino de bacterias en PEAD: (A) convencional; (B) convencional fotooxidado; (C) oxodegradable; (D) oxodegradable fotooxidado.....</i>	113
<i>Figura 7.20 Bacillus sp Gram positivos encontrados en los plásticos expuestos al ambiente marino.....</i>	114
<i>Figura 7.21 Cultivos microbianos (hongos) obtenidos en los diferentes PEAD expuestos en ambiente marino: (A) convencional; (B) oxodegradable; (C) convencional fotooxidado; (D) oxodegradable fotooxidado.....</i>	115
<i>Figura 7.22 Estructura microscópica de las especies encontradas tanto en probetas de PEAD convencional y oxodegradable expuestas en ambiente marino natural: (A) Penicillium sp, (B) Aspergillus sp.....</i>	117
<i>Figura 7.23 Registro fotográfico de la biopelícula en PEAD convencional: (A) sin exposición; expuesto en ambiente natural de agua dulce: (B) 30 días, (C) 180 días.....</i>	119
<i>Figura 7.24 Registro fotográfico de la biopelícula en PEAD convencional fotooxidado: (A) sin exposición; expuesto en ambiente natural de agua dulce: (B) 30 días, (C) 180 días.....</i>	120
<i>Figura 7.25 Registro fotográfico de la biopelícula en PEAD oxodegradable: (A) sin exposición; expuesto en ambiente natural de agua dulce: (B) 30 días, (C) 180 días.....</i>	120
<i>Figura 7.26 Registro fotográfico de la biopelícula en PEAD oxodegradable fotooxidado: (A) sin exposición; expuesto en ambiente natural de agua dulce: (B) 30 días, (C) 180 días.....</i>	120
<i>Figura 7.27 Registro microfotográfico de PEAD convencional: (a) sin exposición; expuesto 180 días: (b) sin afectación observable; (c) con afectación observable.....</i>	121

Estudio de la biodegradabilidad y ecotoxicidad de plásticos oxodegradables

Figura 7.28 Registro microfotográfico de PEAD convencional: (A) sin exposición; expuesto 180 días: (B) sin afectación observable; (C) con afectación observable.....	121
Figura 7.29 Registro microfotográfico de PEAD oxodegradable: (A) sin exposición; expuesto 180 días: (B) sin afectación observable; (C) con afectación observable.....	121
Figura 7.30 Registro microfotográfico de PEAD oxodegradable fotooxidado: (A) sin exposición; (B) expuesto 180 días: sin afectación observable; (C) con afectación observable.....	122
Figura 7.31 Línea de tendencia de las mediciones de porcentaje de elongación para las muestras expuestas en ambiente natural de agua dulce durante 180 días.....	123
Figura 7.32 Espectros FTIR: (A) PEAD Oxodegradable; (B) PEAD oxodegradable fotooxidado inicial; (C) PEAD oxodegradable fotooxidado expuesto 60 días en río.....	126
Figura 7.33 IC en función del tiempo para los diferentes PEAD expuestos en ambiente natural de agua dulce.....	126
Figura 7.34 Fotografía de las trampas en el lugar de exposición (Río Magdalena).....	127
Figura 7.35 Cultivos de hongos de las muestras expuestas en ambiente de agua dulce: (A), (B), (C) género <i>Aspergillus</i> y (D) género <i>Penicillium</i>	129
Figura 7.36 Bacterias encontradas en los plásticos expuestos en el río.....	129
Figura 7.37 Estructura microscópica de las especies encontradas tanto en probetas de PEAD convencional como en PEAD oxodegradable expuestas en ambiente de agua dulce natural: (A) <i>Aspergillus</i> sp.; (B) <i>Penicillium</i> sp.....	131
Figura 7.38 Comparativo de la formación de biopelícula. Especies adheridas en las probetas expuestas en el mar: Ostiones (A), algas (B). Expuestas en el río: depósito de limo del río (C, D).....	132
Figura 7.39 Tendencia comparativa del porcentaje de elongación en ambiente marino (M, izquierda) y ambiente de Río (R, derecha): PEAD convencional (C); PEAD convencional fotooxidado (CO); PEAD oxodegradable (OR); PEAD oxodegradable fotooxidado (OO).....	133
Figura 7.40 Porcentaje de producción de dióxido de carbono en condiciones controladas de laboratorio durante la prueba de biodegradabilidad de los plásticos.....	136
Figura 7.41 Registro microfotográfico de PEAD de prueba (A): Antes de la prueba; (B): Después de la prueba. En su orden Convencional, Oxodegradable, Convencional fotooxidado, Oxodegradable fotooxidado.....	137
Figura 7.42 Curva de crecimiento de la <i>Chlorella</i> sp ($\lambda=647\text{nm}$).....	138
Figura 7.43 Cultivo inicial del microorganismo de prueba, <i>Chlorella</i> sp.....	139
Figura 7.44 Valores de densidad óptica para el ensayo de toxicidad para concentración de plástico PEAD convencional, oxodegradable, y oxodegradable fotooxidado igual a $100,0\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ durante 72 h.....	140
Figura 7.45 Valores de densidad óptica para el ensayo de toxicidad para concentración de plástico PEAD convencional, oxodegradable, y oxodegradable fotooxidado igual a $473,4\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ durante 96 h.....	141
Figura 7.46 Colonias de <i>Chlorella</i> sp después del periodo de observación de 96 horas en las suspensiones de $473,4\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ de los plásticos de prueba.....	142

Estudio de la biodegradabilidad y ecotoxicidad de plásticos oxodegradables

Figura 7.47 Curvas de crecimiento para un periodo de 96 horas de <i>Chlorella sp</i> en cultivo control y en una dispersión de los plásticos PEAD convencional, oxodegradable, y oxodegradable fotooxidado en concentración de 1,0000 g.L ⁻¹	143
Figura 7.48 Curvas de ciclo típico de crecimiento en cultivo control de <i>Chlorella sp</i> y en presencia de los diferentes tipos de plásticos en concentración de 1,0000 g.L ⁻¹	145
Figura 7.49 Caja de valores para el crecimiento promedio diario de biomasa para el PEAD: C, convencional; O, oxodegradable; OO, oxodegradable fotooxidado (1,0000 g.L ⁻¹).....	146
Figura 7.50 <i>Chlorella sp</i> sin adición de nutrientes: (a) Cultivo control a 72 horas;(b) 16 días de crecimiento.	147
Figura 7.51 Comparativo morfológico de la exposición de <i>Chlorella sp</i> en una dispersión 473,4 mg.L ⁻¹ de PEAD oxodegradable: (A) En las primeras 72 horas; (B) Después de 16 días.	147
Figura 7.52 <i>Chlorella sp</i> , expuesta durante 60 días en una dispersión de 473,4 mg.L ⁻¹ de PEAD convencional.....	148
Figura 7.53 Colonias vivas de <i>Chlorella sp</i> , después de 60 días de exposición, en una dispersión de 473,4 mg.L ⁻¹ de PEAD convencional.....	148
Figura 8.1 Mecanismo propuesto para la degradación plásticos.....	153

Estudio de la biodegradabilidad y ecotoxicidad de plásticos oxodegradables

ÍNDICE DE FIGURAS ANEXAS

<i>Figura A1. Gráfica de residuos de los datos de elongación para los plásticos sin exposición.....</i>	187
<i>Figura A2-1. Representación de la prueba de normalidad de los datos de elongación para plásticos expuestos 180 días en ambiente marino y fluvial.....</i>	188
<i>Figura A2-2. Residuos de los datos de elongación de los plásticos expuestos 180 días en ambiente marino</i>	189
<i>Figura A3B-1. Residuos de los datos de porcentaje de elongación de los plásticos expuestos 60 días en ambiente marino</i>	191
<i>Figura A5A-1. Diagrama de caja y bigotes de porcentajes de elongación de los plásticos expuestos en el río 180 días</i>	194
<i>Figura A5B-1. Análisis de residuos de los valores de elongación a la ruptura de de plásticos expuestos 180 días de exposición en ambiente fluvial.....</i>	195
<i>Figura A6-1. Representación de la prueba de normalidad de porcentaje de elongación de los plásticos expuestos en ambiente fluvial</i>	196
<i>Figura A6-2. Residuos de los datos de elongación para materiales expuestos 30 días en ambiente fluvial.....</i>	197
<i>Figura A6-3. Residuos de los datos de elongación de los plásticos expuestos 90 días en ambiente fluvia</i>	199
<i>Figura A6-4. Representación de la prueba de normalidad del porcentaje de elongación de los plásticos expuestos 180 días en ambiente fluvial.....</i>	200
<i>Figura A6-5. Residuos de datos de elongación para plásticos expuestos 180 día en ambiente fluvial.....</i>	200
<i>Figura A8-1. Valores de densidad óptica durante todo el periodo de crecimiento de Chlorella sp, con tres réplicas por experimento</i>	206
<i>Figura A8-2. Anova para datos de densidad óptica durante todo el periodo de crecimiento de Chlorella sp.....</i>	207
<i>Figura A9-1. Registro foto micrográfico mes a mes de PEAD convencional en ambiente marino</i>	208
<i>Figura A9-2. Registro foto micrográfico mes a mes de PEAD convencional fotooxidado ambiente marino.....</i>	208
<i>Figura A9-3. Registro foto micrográfico mes a mes de PEAD oxodegradable en ambiente marino</i>	209
<i>Figura A9-4. Registro foto micrográfico mes a mes de PEAD oxodegradable fotooxidado en ambiente marino.....</i>	209
<i>Figura A9-5. Registro foto micrográfico mes a mes de PEAD convencional en ambiente fluvial</i>	210
<i>Figura A9-6. Registro foto micrográfico mes a mes de PEAD convencional fotooxidado en ambiente fluvial.....</i>	210
<i>Figura A9-7. Registro foto micrográfico mes a mes de PEAD oxodegradable en ambiente</i>	

Estudio de la biodegradabilidad y ecotoxicidad de plásticos oxodegradables

<i>fluvial</i>	211
<i>Figura A9-8. Registro foto micrográfico mes a mes de PEAD oxodegradable fotooxidado en ambiente fluvial.</i>	211

Estudio de la biodegradabilidad y ecotoxicidad de plásticos oxodegradables

ÍNDICE DE TABLAS

<i>Tabla 5.1 Estándares internacionales para análisis de la degradación de materiales plásticos</i>	46
<i>Tabla 5.2 Estándares internacionales para evaluar ecotoxicidad</i>	56
<i>Tabla 5.3 Clasificación de algas</i>	58
<i>Tabla 5.4 Estudios ecotoxicológicos utilizando Clorella sp como organismo indicador</i>	63
<i>Tabla 6.1 Descripción de los plásticos utilizados en la presente investigación</i>	67
<i>Tabla 6.2 Diseño de muestreo en ambientes naturales acuosos tropicales</i>	72
<i>Tabla 6.3 Diseño del experimento de biodegradación</i>	80
<i>Tabla 6.4 Composición del medio de cultivo (g.L⁻¹)</i>	86
<i>Tabla 6.5 Diseño para las pruebas de ecotoxicidad</i>	88
<i>Tabla 7.1 Espesor de las películas de plásticos (µm)</i>	92
<i>Tabla 7.2 Valores de masa promedio en unidad de área de los plásticos de ensayo</i>	93
<i>Tabla 7.3 Valores de densidad promedio de los plásticos de ensayo</i>	93
<i>Tabla 7.4 Frecuencia e intensidad relativas de absorción FTIR de los plásticos objeto de estudio</i>	96
<i>Tabla 7.5 Valores promedio para los parámetros de calidad del agua marina durante los meses de exposición</i>	98
<i>Tabla 7.6 Caracterización del agua marina en Puerto –Velero (Atlántico, Col.)</i>	99
<i>Tabla 7.7 Análisis de varianza para porcentaje de elongación de los materiales expuestos en el mar durante 180 días</i>	107
<i>Tabla 7.8 Principales bandas de absorción FTIR del PEAD oxodegradable expuesto 180 días en mar</i>	108
<i>Tabla 7.9 Promedio de colonias de bacterias en los plásticos expuestos en ambiente marino</i>	111
<i>Tabla 7.10 Promedio de colonias de hongos en los plásticos expuestos en ambiente marino</i>	112
<i>Tabla 7.11 Identificación de poblaciones microbianas presentes en los plásticos expuestos en ambiente acuoso marino</i>	116
<i>Tabla 7.12 Valores promedio para los parámetros de calidad del agua dulce durante los meses de exposición en el Río Magdalena, lugar Las Flores (Barranquilla, Atlántico)</i>	118
<i>Tabla 7.13 Caracterización del agua dulce de una muestra puntual en Las Flores</i>	119
<i>Tabla 7.14 Pérdida de masa de los plásticos estudiados en ambiente de agua dulce, comparando valor inicial con valor a 180 días de exposición</i>	122
<i>Tabla 7.15 Análisis de varianza para porcentaje de elongación de los materiales expuestos en el río para cada mes de exposición</i>	124
<i>Tabla 7.16 Principales bandas de absorción FTIR de PEAD oxodegradable expuesto 180 días en ambiente natural de agua dulce</i>	125
<i>Tabla 7.17 Promedio de colonias de bacterias en los plásticos expuestos en el río</i>	128
<i>Tabla 7.18 Promedio de colonias de hongos y levaduras en los plásticos expuestos en ambiente de</i>	128

Estudio de la biodegradabilidad y ecotoxicidad de plásticos oxodegradables

<i>Tabla 7.19 Identificación de poblaciones microbianas presentes en los plásticos expuestos en ambiente acuoso de río.....</i>	<i>130</i>
<i>Tabla 7.20 Valores de ANOVA unidireccional para los datos conjuntos en los dos medios de porcentaje de elongación a la ruptura.....</i>	<i>134</i>
<i>Tabla 7.21 Características del inóculo utilizado en pruebas de biodegradabilidad.....</i>	<i>135</i>
<i>Tabla 7.22 Estadístico t student para la concentración de plástico de 473,4 mg.L⁻¹.....</i>	<i>141</i>
<i>Tabla 7.23 Análisis de varianza para la concentración de plástico de 473,4 mg.L⁻¹ y periodo de exposición de 96 horas.</i>	<i>142</i>
<i>Tabla 7.24 Valores de t, para los tratamientos PEAD convencional, oxodegradable, y oxodegradable fotooxidado, comparados con muestra control en 1000 mg.L⁻¹.....</i>	<i>144</i>
<i>Tabla 7.25 ANOVA en prueba de toxicidad de los plásticos (concentración de 1000 mg.L⁻¹).</i>	<i>145</i>

Estudio de la biodegradabilidad y ecotoxicidad de plásticos oxodegradables

ÍNDICE DE TABLAS ANEXAS

<i>Tabla A3-1 ANOVA unidireccional de porcentaje de elongación de los plásticos expuestos 60 días en ambiente marino</i>	190
<i>Tabla A4. Características morfológicas de microorganismos encontrados en probetas expuestas en ambiente marino</i>	192
<i>Tabla A5-1 ANOVA unidireccional de porcentaje de elongación de los plásticos expuestos 180 días en ambiente fluvial</i>	193
<i>Tabla A6-1 ANOVA unidireccional de porcentaje de elongación de los plásticos expuestos 30 días en ambiente fluvial.....</i>	197
<i>Tabla A6-2 ANOVA Unidireccional de porcentaje de elongación para plásticos expuestos 90 días en ambiente fluvial</i>	198
<i>Tabla A6-3 ANOVA unidireccional de porcentaje de elongación para plásticos expuestos 180 días en ambiente fluvial.....</i>	199
<i>Tabla A7 Características morfológicas de microorganismos encontrados en probetas expuestas en ambiente fluvial</i>	201
<i>Tabla A8-1. Valores de densidad óptica durante todo el periodo de crecimiento de Chlorella sp. con tres réplicas para cada clase de plástico</i>	202
<i>Tabla A8-2. ANOVA y prueba de comparaciones de Tukey para pruebas de ecotoxicidad con Chlorella sp tratamiento testigo.....</i>	202
<i>Tabla A8-3 ANOVA y prueba de comparaciones de Tukey para pruebas de ecotoxicidad en tratamiento PEAD convencional.....</i>	203
<i>Tabla A8-4. ANOVA y prueba de comparaciones de Tukey para pruebas de ecotoxicidad en tratamiento PEAD oxodegradable.....</i>	202
<i>Tabla A8-5. ANOVA y prueba de comparaciones de Tukey para pruebas de ecotoxicidad tratamiento PEAD oxodegradable fotooxidado.....</i>	204
<i>Tabla A8-6. Valores promedio para el crecimiento de la biomasa en términos de densidad óptica para dispersiones de los plásticos en dispersión de 1000 mgL⁻¹.....</i>	204
<i>Tabla A8-7. ANOVA unidireccional para valores promedio de las pruebas de ecotoxicidad para blanco y los plásticos ensayados.....</i>	205

ÍNDICE DE ANEXOS

<i>ANEXO 1 Normalización de los datos de materiales originales.</i>	<i>187</i>
<i>ANEXO 2. Normalización de datos conjuntos mar-río para 180 de exposición.</i>	<i>188</i>
<i>ANEXO 3 Estadística de datos para plásticos expuestos en el mar 60 días.</i>	<i>190</i>
<i>ANEXO 4. Características de microorganismos presentes en probetas expuestas en el mar.</i>	<i>192</i>
<i>ANEXO 5 Estadísticas para materiales expuestos en río.....</i>	<i>193</i>
<i>ANEXO 6 Estadísticas para materiales expuestos en río para 30, 90 y 180 días.....</i>	<i>196</i>
<i>ANEXO 7. Características de microorganismos encontrados en probetas expuestas en río.</i>	<i>201</i>
<i>ANEXO 8. Densidad óptica en pruebas de ecotoxicidad.....</i>	<i>202</i>
<i>ANEXO 9. Fotomicrografías de materiales expuestos en mar y río.</i>	<i>208</i>

ACRÓNIMOS Y ABREVIATURAS

AD	Estadístico de Anderson-Darling
ANOVA	Análisis de varianza
ASTM	Sociedad Americana para Pruebas y Materiales
ATR	Reflectancia total atenuada
BPA	Bisfenol A
BS	Normas británicas
CEN	Comité europeo de normalización
CI50	Concentración de inhibición media
CL50	Concentración letal media
COPs	compuestos orgánicos persistentes
CPSE	Concentración prevista sin efecto
DDT	Diclorodifenil tricoloroetano
DSS	Distribución de sensibilidad de especies
EC50	Concentración efectiva media
FTIR	Espectroscopía de infrarrojo con transformadas de Fourier
HAPs	Hidrocarburos aromáticos policíclicos
ICONTEC	Instituto colombiano de normas técnicas y certificación
ISO	Organización Internacional de Normalización
JIS	Normas industriales japonesas
NOEC	Concentración sin efecto observado
NTC	Norma Técnica Colombiana
OCDE	Organización para la Cooperación y el Desarrollo Económico
OD	Oxígeno disuelto
PBDEs	Polibromodifenil éteres
PBTs	Sustancias bioacumulativas, persistentes y tóxicas
PCBs	Policloro bifenilos
PE	Polietileno
PEAD	Polietileno de alta densidad
PEBD	Polietileno de baja densidad
PELBD	Polietileno lineal de baja densidad
PP	Polipropileno
PVC	Policloruro de vinilo
SEM	Microscopía electrónica de barrido
TDPA®	Aditivos Plásticos Totalmente Degradables
UV	Ultravioleta

RESUMEN

El polietileno es ampliamente utilizado en envases debido a su estabilidad química, ligereza, impermeabilidad y bajo costo. Sin embargo, estas propiedades se convierten en problemas cuando el material se descarta. Los plásticos oxodegradables (significando que son materiales con aditivos prooxidantes o prodegradantes), que se degradan por un proceso abiótico-biótico, han sido promovidos como una solución a la contaminación causada por los plásticos. Esta investigación evalúa la degradabilidad del polietileno de alta densidad convencional y oxodegradable en ambientes tropicales marinos y de agua dulce. Las muestras de estos plásticos, con y sin degradación abiótica previa, fueron expuestas a la intemperización directa, en el Mar Caribe y el Río Magdalena, en Colombia. Su degradación se evaluó durante seis meses mediante la formación de grupos carbonilo, disminución en el porcentaje de elongación a la ruptura y evidencia visual de deterioro. Se observó una degradación más rápida en las condiciones marinas, evidenciando que la salinidad, la presencia de microorganismos, la radiación ultravioleta natural y la temperatura son los promotores más relevantes de la degradación, especialmente para los plásticos oxodegradables, como lo demuestra el aumento del índice de carbonilo. Todos los especímenes mostraron formación de biopelícula o depósito microbiano, en algunos casos grietas y fragmentación, especialmente en ejemplares de polietileno de alta densidad oxidados en el medio marino. Se observó que los plásticos oxodegradables, y en menor grado los convencionales, iniciaron su proceso de degradación, en términos de pérdida completa de sus propiedades mecánicas, sin embargo no lograron una completa desintegración o mineralización. En este sentido se puede afirmar que los plásticos oxodegradables se degradan más rápidamente que los plásticos convencionales en condiciones naturales, debido fundamentalmente a la presencia de aditivo prodegradante, sin embargo este aditivo no garantiza la mineralización del material. Si bien es cierto que la degradación ocurrió en condiciones naturales, la biodegradación no se logró en condiciones controladas de laboratorio debido a que la prueba respirométrica no fue contundente para determinar la biodegradabilidad de los materiales. Se debe añadir que los materiales ensayados en pruebas controladas en laboratorio mostraron que no son tóxicos para el microorganismo *Chlorella sp*, lo cual no significa que la presencia de plásticos en ambientes naturales no produzca impactos adversos. Por tanto sólo se podrá evitar el daño ocasionado por los plásticos si se implementan políticas públicas y medidas que conduzcan a desestimular el consumo logrando un uso racional de los plásticos y una disposición adecuada de los residuos.

ABSTRACT

Polyethylene is widely used in packaging due to its chemical stability, lightness, impermeability and low cost. However, these properties become problems when the material is discarded. Oxodegradable plastics, which are degraded by an abiotic-biotic process, have been promoted as a solution to the pollution caused by plastics. This research evaluates the degradability of conventional and oxodegradable high density polyethylene in tropical marine and freshwater environments. Samples of these plastics, with and without previous abiotic degradation, were exposed to direct weathering in the Caribbean Sea and the Magdalena River in Colombia. Its degradation was evaluated during six months by formation of carbonyl groups, decrease in the percentage of elongation at break and visual evidence of deterioration. A faster degradation was observed in the marine conditions, evidencing that salinity, presence of microorganisms, natural UV radiation and temperature are the most important promoters of degradation, especially for the oxodegradable plastics, as evidenced by the increase of carbonyl index. All specimens showed biofilm formation, in some cases cracking and fragmentation; especially in high-density polyethylene (HDPE) oxidized in the marine environment. It was observed that the oxodegradable plastics and, to a lesser extent, conventional plastics, began their degradation process, in terms of complete loss of their mechanical properties, but did not achieve complete disintegration or mineralization. In this sense it can be affirmed that oxodegradable plastics degrade more rapidly under natural conditions, mainly due to the presence of a pro-oxidant, however this additive does not guarantee complete mineralization of the material. Although it is true that the degradation occurred under natural conditions, biodegradation was not achieved under controlled laboratory conditions because the respirometric test was not conclusive to determine the biodegradability of the materials. It should be added that the tested showed that they are not toxic to the microorganism *Chlorella* sp. However, this does not mean that the presence of plastics in natural environments does not produce adverse impacts. Therefore, damage can only be avoided if measures that lead to an adequate disposal of plastic wastes under controlled conditions are implemented

Capítulo I

INTRODUCCIÓN

1 INTRODUCCIÓN

Es innegable que los plásticos, entre los cuales se encuentra el polietileno, han permeado la vida de todos los habitantes del planeta en forma directa o indirecta, de hecho, son materiales que dominan la esfera del consumo en la actualidad. Aun cuando es deseable una desaceleración de la producción en el largo plazo como consecuencia de las presiones derivadas del cambio climático y de la basura marina, entre otros problemas asociados, se hace necesario generar conocimiento en busca de alternativas para los problemas que actualmente genera la disposición final de estos materiales.

Se ha considerado que una alternativa para disminuir el impacto de los plásticos en el ambiente es la producción de plásticos oxodegradables.

Este documento está dividido en seis capítulos: El capítulo uno corresponde a la introducción; el capítulo dos se refiere a los objetivos, el capítulo tres muestra el marco teórico, el capítulo cuatro describe la metodología, el capítulo cinco muestra los resultados y la discusión; el capítulo seis corresponde a las conclusiones y recomendaciones de la presente investigación.

Antecedentes

Las externalidades de los residuos plásticos en el planeta parecen invisibles para la mayoría de las personas pues las personas pagan para deshacerse de su basura, parece que se ignora la capacidad finita del planeta para transformar los desechos, sobre todo si se piensa en la incapacidad de los sistemas vivos de transformar materiales creados por el hombre, tales como los plásticos.

La versatilidad, el bajo costo aparente, facilidad de manejo (moldeado en múltiples formas), liviandad, higiene y durabilidad hacen de los plásticos materiales de alto consumo. Sin embargo, esta última propiedad preocupa a investigadores, autoridades y a la sociedad misma; la mineralización de estos materiales, como objetivo deseable para evitar los potenciales daños en ambientes naturales, no ha sido demostrada en plásticos como el polietileno

Derivado del paradigma “usar y tirar”, los residuos plásticos han aparecido en cualquier lugar del planeta, incluso en islas no habitadas (Barnes *et al.*, 2009). Se considera que algunos plásticos cuando llegan al ambiente se descomponen y en ocasiones se producen sustancias peligrosas que se pueden dispersar en ecosistemas acuáticos (Bernstein, 2009), o se asocian a sustancias peligrosas (Mathalon y Hill, 2014); se fragmentan, por la acción de factores abióticos tales como la radiación solar, en partículas pequeñas de diversas formas (Thompson *et al.*, 2004). Dichos fragmentos llegan al hombre a través de los alimentos marinos (Cole y Galloway, 2015; Wallace *et al.*, 2016) e incluso en la sal marina (Yang *et al.*, 2015); de igual manera llegan a los animales causando daño e incluso la muerte (Barnes *et al.*, 2009). Al parecer los sistemas de tratamiento de los residuos plásticos tradicionales, tales como el reciclaje y la

Estudio de la biodegradabilidad y ecotoxicidad de plásticos oxodegradables

incineración, la recuperación energética (Al-Salem *et al.*, 2010) no han sido suficientes, falta mayor compromiso de las partes interesadas, educación, mejoramiento en los sistemas de recolección, economías de escala, lo que además sugiere que la adecuada gestión de los residuos debe ser liderada desde las políticas públicas, para lograr incrementos en el tiempo de la cuota de reciclaje de los residuos plásticos de empaque que en la actualidad es sólo de 14% (Dahlbo, 2017).

En este orden de ideas y teniendo en cuenta que el polietileno (PE) es uno de los plásticos de mayor producción en el mundo (PlasticsEurope, 2015), y además que es uno de los materiales más resistentes a la degradación microbiana, se ha diseñado el polietileno oxodegradable, el cual retiene todas las propiedades de uso del material convencional y además podría degradarse en ambientes naturales (Ammala *et al.*, 2011), lugares en los cuales no deberían aparecer estos materiales. Los plásticos con agentes oxodegradables, se caracterizan porque contienen aditivos que facilitan que el plástico se oxide en presencia de luz o de calor o ambos. Teniendo en cuenta el aumento del consumo mundial de plásticos como el polietileno, la intencionalidad de la tecnología oxodegradable es responder a la necesidad creciente de tener materiales que se puedan oxidar en condiciones ambientales (oxígeno del aire, luz, temperatura) para transformarse sustancias no tóxicas y que puedan ser mineralizadas con la intervención de los microorganismos (Ammala *et al.*, 2011).

Muchas investigaciones han sido realizadas con el objeto de conocer la biodegradabilidad del polietileno. En este estudio se propone aumentar el conocimiento en esta línea estudiando el comportamiento de PEAD (polietileno de alta densidad) oxodegradable y convencional en ambientes reales de agua dulce y agua salada, por ser estos ecosistemas receptores y reservorios de materiales plásticos.

Capítulo II

JUSTIFICACIÓN

2 JUSTIFICACIÓN

La mayoría de los plásticos que se han producido están todavía presentes en el planeta. Polímeros sintéticos, específicamente el polietileno, se han considerado tradicionalmente recalitrantes, lo cual significa que son resistentes a la degradación tanto abiótica como por los microorganismos o las enzimas que estos secretan.

La inercia química y biológica de los plásticos (Mueller, 2006), ha permitido encontrarlos en el sistema digestivo y otros órganos de muchas especies (Teuten *et al.*, 2009). Sumado a los problemas de carácter físico se especula que la ingesta potencia la entrada de sustancias tóxicas a las cadenas alimenticias (Teuten *et al.*, 2009). Se conoce que a estos materiales se les han adicionado durante el proceso de manufactura, sustancias que pueden ser nocivas para los humanos y los ecosistemas (Syberg *et al.*, 2015; Talsness *et al.*, 2015; Thompson *et al.*, 2009a).

Sin embargo, existe controversia sobre el uso de los materiales prooxidantes, pues aunque investigaciones validan la suposición de mejoramiento de la degradación (Roy *et al.*, 2006; Sudhakar *et al.*, 2007), otras han mostrado que durante el periodo de observación, los plásticos oxodegradables se comportaron de manera semejante a los plásticos convencionales (O'Brine y Thompson, 2010).

Colombia, con sus más de 1000 industrias productoras de plásticos, utiliza aditivos, entre los que se destacan, TDPA™ (Aditivos Plásticos Totalmente Degradables), d2W® para la producción de plásticos oxodegradables principalmente polietileno. No existe una regulación específica para la producción y consumo de estos materiales que garantice la degradabilidad y biodegradabilidad en las condiciones de los rellenos sanitarios, es el método oficial para el tratamiento de los residuos domésticos. Esta situación ha generado un alto consumo, so pretexto de mineralización una vez finalizado el uso de dichos materiales.

No se conoce el impacto de estos plásticos oxodegradables en los ambientes marinos y en los ríos, a los que pueden llegar debido a malas prácticas de manejo. Esto es relevante para el caso particular de la ciudad de Barranquilla, Colombia, una ciudad costera, rodeada por el Mar Caribe y bañada por el Río Magdalena. Este río atraviesa todo el país arrastrando consigo una enorme cantidad de materiales, entre ellos los plásticos, específicamente bolsas de supermercado. Sumado a esta situación y dada la incultura de los ciudadanos, muchos arrojan las bolsas de basura a los arroyos que se forman dentro de la ciudad en época de lluvia siendo arrastrados hasta el Mar Caribe.

Este estudio sometió a prueba en ambientes acuáticos reales, en el mar Caribe y en el Río Magdalena, el plástico PEAD convencional y oxodegradable con sin fotooxidación previa, con el objeto de evaluar la eficacia del agente prodegradante, además de observar en condiciones controladas de laboratorio la biodegradabilidad y compararla con los resultados de las pruebas

Estudio de la biodegradabilidad y ecotoxicidad de plásticos oxodegradables

en ambiente real. Estas acciones permiten conocer cuál podría ser el destino final y la incidencia de estos materiales una vez se han dispersado en el ambiente y reconocer la eficacia para la degradación abiótica y biótica en condiciones naturales de los aditivos prooxidantes.

Teniendo en consideración que la mayoría de investigaciones relativas a plásticos oxodegradables se han realizado en países con estaciones y muy poca información se encuentra en la literatura acerca del comportamiento de la degradación de plásticos en ambientes tropicales, se propuso desarrollar la investigación en ambientes tropicales naturales de agua de mar y agua de río, donde el periodo de brillo solar es cercano 6-10 horas/día y la temperatura oscila entre 27 y 36 grados °C, con promedio de radiación global entre 5,0-5,5 kWh.m², con valores de temperatura media del agua en mar y río sobre 29 °C.

Adicionalmente, medir los daños potenciales a los ecosistemas es un reto. Por ello, en este trabajo se utilizó para medir la ecotoxicidad de los plásticos la especie *Chlorella* sp. Esta es una especie que ha sido muy utilizada en diferentes aplicaciones, tales como tratamiento de aguas residuales (Li *et al.*, 2011), biosorción de metales, entre otras (Maznah *et al.*, 2012). Usando dicha especie como indicador ambiental, se midió la toxicidad derivada del polietileno de alta densidad convencional y oxodegradable.

Capítulo III

OBJETIVOS

3 OBJETIVOS

En este capítulo se describen los objetivos de la presente investigación.

3.1 Objetivo general

Evaluar los procesos de oxodegradación, biodegradación y ecotoxicidad de polietileno de alta densidad, convencional y oxodegradable en ambientes acuáticos naturales y en procesos controlados que simulen ambientes acuáticos tropicales.

3.2 Objetivos específicos

Someter el PEAD convencional y oxodegradable, con y sin proceso de fotooxidación previa, a pruebas de degradación en ambientes marinos reales.

Someter el PEAD convencional y oxodegradable, con y sin proceso de fotooxidación previa, a pruebas de degradación en ambientes de agua dulce reales.

Evaluar la biodegradabilidad en condiciones controladas de laboratorio utilizando un consorcio microbiano natural, según norma ASTM D6691-01.

Analizar en laboratorio la degradación sufrida por los materiales en los distintos entornos.

Evaluar la ecotoxicidad para algas de los materiales seleccionados en función de su degradación previa.

Capítulo IV

HIPÓTESIS

4 HIPÓTESIS

Es posible determinar el grado de biodegradabilidad y ecotoxicidad del polietileno de alta densidad oxodegradable en ambientes acuáticos reales y en situaciones controladas de laboratorio, simulando las condiciones de ambientes acuáticos tropicales.

Capítulo V

MARCO TEÓRICO Y ANTECEDENTES

5 MARCO TEÓRICO Y ANTECEDENTES

A continuación se expondrán aspectos teóricos y antecedentes en la investigación de los materiales estudiados. Se revisarán aspectos relativos a la degradación que tiene lugar en condiciones de intemperie en ambientes acuáticos, la biodegradación bajo condiciones controladas y las pruebas de ecotoxicidad.

5.1 Los plásticos

El término plástico se aplica a un amplio espectro de materiales que pueden ser moldeados, aplicados como recubrimiento, extruidos y tienen múltiples aplicaciones. Se obtienen en forma sintética por polimerización de monómeros derivados de combustibles fósiles, principalmente petróleo, gas y carbón (Derraik, 2002). Entre las características de los plásticos se encuentran: su capacidad como aislante térmico y eléctrico, alta relación resistencia-densidad, resisten el ataque ácido, básico y de disolventes, su alta inercia química y resistencia al ataque microbiano. Los plásticos pueden ser reforzados con diferentes aditivos, como retardantes de llama, estabilizadores y antioxidantes.

El antecesor de los plásticos modernos es el celuloide. Hyatt, en 1869, plastificó nitrocelulosa con alcanfor. Posteriormente, en 1907, se inicia la era de los plásticos modernos con la fabricación de la bakelita, un polímero hecho con fenol y formaldehído. El PE, descubierto por el alemán Hans von Pechmann, fue sintetizado y caracterizado en 1933, sin embargo, solo se masificó cuando se descubrió el catalizador (Ziegler-Natta), que hizo posible su síntesis a presión normal, proceso mucho más económico. En la misma época se sintetizaron el poliestireno, el policloruro de vinilo (PVC) y el nylon, plásticos de gran utilidad en la Segunda Guerra Mundial. Esto permitió un gran desarrollo e impulsó la industria de estos materiales y la generación de otros plásticos (Crawford y Quinn, 2017).

Esta gigantesca industria en la actualidad usa aproximadamente el 8 % de la extracción mundial de petróleo para su fabricación (Thompson *et al.*, 2009a). Desde 1907 hasta el año 2015 la producción de los plásticos ha mostrado incremento permanente. En el año 2017, la producción de plásticos en el mundo alcanzó la cifra de 280 millones de toneladas (PlasticsEurope, 2017), con un crecimiento cercano al 4%, comparado con el año inmediatamente anterior. Dicha producción anual mundial representa aproximadamente 40 kg de plásticos producidos anualmente para cada uno de los 7 mil millones de seres humanos en el planeta, que se aproxima a la biomasa humana total (Zettler *et al.*, 2013).

De la producción mundial de plásticos (280 Mton), América Latina produce el 5%, la región asiática 50% (China con 29%), América del Norte 18 %, Europa 19%, África 7% (PlasticEurope, 2017). Esta alta producción de plásticos y el bajo aprovechamiento que actualmente se hace de sus corrientes residuales ocasionan aumento y acumulación en el medio natural, en los rellenos sanitarios y otros sitios de disposición final, desencadenando una situación

Estudio de la biodegradabilidad y ecotoxicidad de plásticos oxodegradables

insostenible (Thompson *et al.*, 2009b). La figura 3.1, muestra los porcentajes de la demanda por familia de plástico.

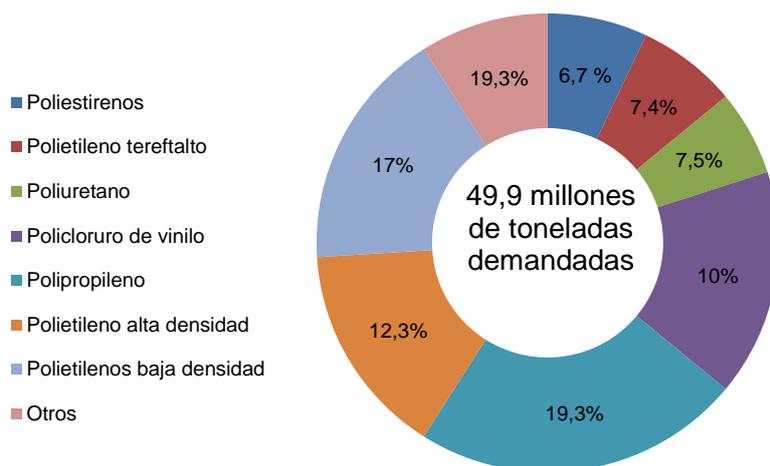


Figura 5.1 Demanda europea de plásticos por tipo de resina.

Adaptado de PlasticEurope.org (2017).

En Colombia, en el año 2016, el crecimiento de la industria fue de 6.0% y en los últimos 10 años ha sido de 7%, según cifra revelada por Acoplásticos, el gremio de productores de estos materiales. El consumo anual de productos plásticos en el país es cercano a 28 kg por habitante; sin embargo, a raíz del impuesto a las bolsas de supermercado y a la desaceleración de la economía, la demanda ha decaído alrededor del 25% respecto al año 2016 (Mitchell, 2017). Además señala esta agremiación que el reciclaje es muy bajo, llega sólo al 20% de los materiales potenciales de reciclaje, y por tanto se hace importante crear los incentivos que garanticen tasas de reutilización y reciclaje más elevadas.

Los plásticos pueden ser clasificados de acuerdo a diferentes características. Por ejemplo, se clasifican de acuerdo a su estructura y su comportamiento térmico como elastómeros, termoestables y termoplásticos. De acuerdo a la degradabilidad, pueden ser materiales biodegradables y no biodegradables.

Un grupo particularmente importante de los materiales plásticos son las poliolefinas, caracterizadas por su baja densidad, alta estabilidad química, baja absorción de agua y buena resistencia al desgaste. En 2016, la demanda de las poliolefinas constituyó 55,0% de la demanda de plásticos, siendo polipropileno (PP) 23,0% y los diferentes tipos de PE 32,0%

Estudio de la biodegradabilidad y ecotoxicidad de plásticos oxodegradables

(PlasticEurope, 2016), materiales utilizados principalmente en empaques y en menor medida en la agricultura. Conviene subrayar que las poliolefinas, son reconocidas por su alta bioinercia, es decir, no son asimilables por los microorganismos (hongos, bacterias y algas), debido a su estructura molecular hidrofóbica que impide a la microflora utilizarlos como fuente de energía, en consecuencia su alta producción y su baja biorreactividad convierte a estos materiales en un problema global con consecuencias aún no totalmente claras.

Del grupo de poliolefinas, los polietilenos son lo que han recibido mayor atención, debido al incremento en la producción y a la alta demanda que la actual sociedad de consumo hace de ellos como material de empaque (Ammala *et al.*, 2011; Lucas *et al.*, 2008; Shah *et al.*, 2008). El problema asociado a su uso es la disposición final, directamente ligado con su ciclo de vida, debido a que generalmente se utilizan en aplicaciones de vida útil corta y porque se desechan de manera inapropiada, contaminando ambientes acuáticos como los océanos (Ryan *et al.*, 2009). Estos materiales poseen una alta inercia química y biológica y por tanto su degradación resulta muy compleja.

La búsqueda de un equilibrio entre la durabilidad y la biodegradabilidad de los plásticos es un tema complejo. En el caso de diseño de materiales poliméricos para industrias, como la espacial y la aeronáutica, se requiere una gran estabilidad y por tanto larga duración; por el contrario, en el diseño de materiales de empaque, como bolsas para supermercados, una opción deseable es que el ciclo de vida sea corto, que ofrezca resistencia durante su utilización y biodegradabilidad después de su uso.

5.1.1 Polietileno

El PE, desde el punto de vista de la composición química, es el polímero más sencillo, obtenido por la polimerización del etileno. Es parcialmente cristalino y parcialmente amorfo. La estructura química del PE es $(-\text{CH}_2-\text{CH}_2-)_n$, donde n , es número de veces que se repita esta unidad básica, que depende del tipo de catalizador utilizado en la reacción química, la temperatura y la presión. Esta molécula está compuesta en su unidad estructural por dos átomos de carbono y cuatro átomos de hidrógeno unidos todos por enlaces de tipo covalente. La fuerza de los enlaces C-C y C-H es 347 y 414 KJ/mol, respectivamente (Chang, 2010).

Su estructura puede ser compleja en función de las condiciones de operación o síntesis durante la polimerización y por ello diversos tipos de polietileno se encuentran en el mercado. Varios tipos de materiales están incluidos en el nombre de polietileno (Fatou, 1985):

Polietileno de baja densidad (PEBD). Obtenido por polimerización radical con peróxidos a alta presión. Presenta cadenas muy ramificadas con sustituyentes alquilo que se producen durante el proceso de síntesis y posee baja cristalinidad como consecuencia de ovillamientos moleculares que producen zonas amorfas, por ello la densidad puede variar, aunque en promedio se obtienen valores 0.910 a 0.940 g.cm⁻³. La temperatura de fusión asociada a la pérdida de ordenamiento molecular de la fase cristalina puede variar desde 105 °C hasta 120

Estudio de la biodegradabilidad y ecotoxicidad de plásticos oxodegradables

°C. Se utiliza para fabricar empaques, materiales para invernaderos, embalajes, bolsas de acarreo de productos entre otros.

Polietileno lineal de baja densidad (PELBD). Se obtiene en procesos de polimerización con comonómeros (1-buteno, 1-hexeno) a baja presión, en presencia de catalizador (titanio o de Ziegler, dependiendo del tipo de proceso). El producto obtenido es de cadena lineal con ramificaciones uniformes, lo cual permite exhibir buenas propiedades mecánicas y resistencia a efectos de agrietado ambiental. Se utiliza para fabricación de empaques, forros, en películas termo contraíbles, entre otros.

Polietileno de alta densidad. Se obtiene por polimerización en fase gaseosa del etileno de alta pureza y en presencia de catalizadores (Ziegler-Nata; proceso Phillips, metalocenos). El producto es un polímero de alta cristalinidad, sin embargo, puede exhibir zonas amorfas. La relación entre las zonas cristalinas, interfacial y las zonas amorfas es denominada grado de cristalinidad. El grado de ramificación es bajo, por tanto, presenta alta cristalinidad y altos valores de densidad $940-960 \text{ kg.m}^{-3}$. La cristalinidad es una función de la temperatura del proceso, velocidad de formación de los cristales y tratamientos mecánicos posteriores. Esta propiedad determina las propiedades térmicas y mecánicas del material. Se utiliza para fabricar envases, canastas de bebidas, recipientes para contener sustancias, bolsas para acarreo de productos, entre muchos otros usos.

La figura 5.2, muestra una micrografía del PEAD y esquemáticamente considera las principales clases de polietileno.

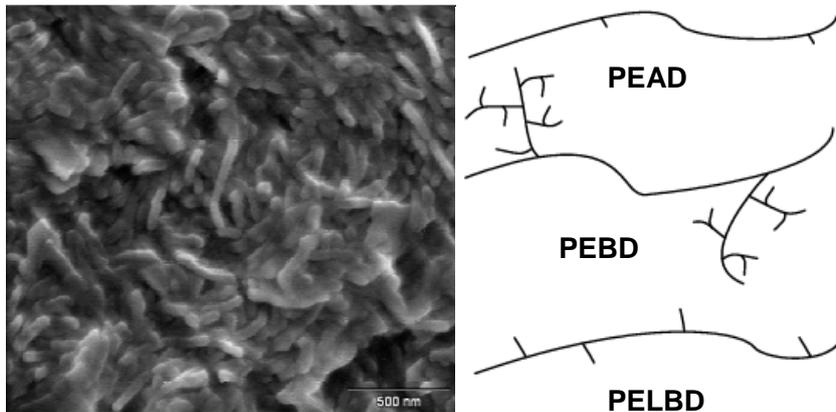


Figura 5.2 Micrografía del PEAD correspondiente a la morfología lamelar y estructura esquemática de los PEAD, PEBD, y PELBD (adaptado de Prin *et al.*, 2011).

Dentro de las características para destacar en el PEAD es el contenido de aditivos. Para mejorar el desempeño, color y textura se agregan sustancias tales como: pigmentos orgánicos

Estudio de la biodegradabilidad y ecotoxicidad de plásticos oxodegradables

e inorgánicos (pigmentos fluorescentes, óxidos y sales de metales); agentes antiestáticos, estabilizantes, lubricantes, agentes de relleno (mejoran la resistencia térmica, reducen agrietamiento y mejoran propiedades químicas, mecánicas y eléctricas), antioxidantes, plastificantes (mejoran maleabilidad, flexibilidad y procesado) y retardantes de llama (Ammala *et al.*, 2011).

La consecuencia de los aditivos es un mejoramiento de diferentes propiedades de los materiales, en ocasiones mediante el aumento de la durabilidad de los materiales. El problema derivado de la persistencia de los plásticos ha generado la creación de plásticos oxodegradables, los cuales serán revisados en la siguiente sección.

Plásticos degradables y biodegradables

Puede esperarse que el efecto de los residuos plásticos en la salud humana y el ambiente será creciente, por lo que las políticas públicas, los procesos de investigación y la innovación deberán estar en armonía en el futuro para propiciar un uso racional y sustentable de estos materiales (Knoblauch, 2009; Lithner *et al.*, 2011; O'Brine y Thompson, 2010). Ante esta intrincada situación y respondiendo a las necesidades antes planteadas, se han realizado esfuerzos para desarrollar plásticos degradables, que sean mineralizados en los ciclos vitales naturales.

La degradación de los plásticos se ve afectada por parámetros ambientales y moleculares. Los parámetros ambientales incluyen la temperatura, la presencia de oxígeno y la radiación, entre otros. El ambiente (intemperie, envejecimiento y enterramiento) puede causar transformaciones por efectos de la radiación, mecánicos, térmicos, y químicos, factores que contribuyen a debilitar la estructura polimérica. Esta exposición de carácter abiótico puede contribuir al proceso de degradación y favorece la biodegradación (Albertsson y Karlsson, 1990; Lucas *et al.*, 2008). Los parámetros estructurales se relacionan con la presencia de grupos funcionales oxidados sobre la cadena polimérica, que son grupos lábiles y ejercen una marcada influencia en el proceso de deterioro de las macromoléculas poliméricas, al promover la disminución de las masas molares y por tanto la posibilidad del ataque microbiano (Chandra y Rustgi, 1998; Daglen y Tyler, 2010).

Plásticos oxodegradables

Son plásticos convencionales a los cuales se les ha agregado un aditivo para facilitar su degradación mediante la oxidación (Yashchuk *et al.*, 2012). A diferencia de los polímeros biodegradables, que presentan propiedades que restringen su uso y cuyo costo supera 2.5-10 veces el de los materiales convencionales (Ren, 2003). Estos materiales son el resultado de modificaciones a los plásticos tradicionales provenientes de fuentes no renovables (gas natural, petróleo, carbón) y renovables (caña, maíz).

Estudio de la biodegradabilidad y ecotoxicidad de plásticos oxodegradables

La tecnología prodegradante se inició con la adición de grupos fotosensibles a la cadena polimérica principal y fue patentada hacia 1940 (Albertsson *et al.*, 1994). Actualmente ha logrado una importante incursión en el mercado de los plásticos (Ammala *et al.*, 2011). Se conocen algunos nombres de aditivos prooxidantes comerciales como, Addi_Flex, d₂W, TPDA, Reverté, Renature y Scott-Gilead.

Los aditivos en general son materiales orgánicos e inorgánicos que se incorporan a los plásticos durante su transformación para modificar sus propiedades de desempeño, controlar la influencia de factores físicoquímicos y alargar su tiempo de vida útil. Los aditivos prodegradantes son sales de metales de transición, las más comúnmente usadas son sales de hierro, que es un foto sensibilizador, así como de cobalto y manganeso, que son sensibilizadores térmicos (Ammala *et al.*, 2011). Los metales usados se combinan con ácidos orgánicos de alta masa molar, produciendo sales solubles en la mezcla de obtención del plástico. Los metales son capaces de transferir químicamente el oxígeno e incorporarlo a la cadena hidrocarbonada del polímero. Los estados de oxidación de estos metales influyen en la actividad catalítica (Jakubowicz, 2003). Los complejos de metales de transición actúan como foto activadores, aún en polímeros que contienen antioxidantes y estabilizadores.

El mecanismo de acción de metales de transición como catalizadores en la oxidación de hidrocarburos, tradicionalmente ocurre a partir de la reacción de radical hidroxilo (OH[•]), perhidroxilo (HO₂[•]) o radicales superóxido (O₂^{•-}), produciendo un radical hidrocarbonado, el cual reacciona con el oxígeno del aire para producir un hidroperóxido (ROOH). Éste, en presencia del metal, genera radicales alcóxidos y peróxidos (Figura 5.3).

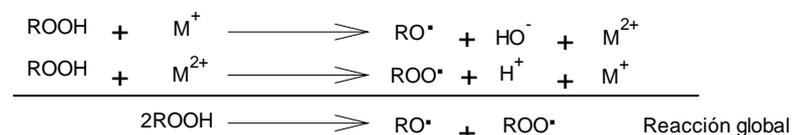


Figura 5.3 Formación de radicales alcóxidos y peróxidos a partir de la descomposición de hidroperóxidos catalizadas por iones metálicos (Ammala *et al.*, 2011).

También son usados como agentes prodegradantes sistemas libres de metales de transición, mediante la adición de pequeñas cantidades de sustancias con grupos cromóforos, capaces de sufrir degradación química por absorción de radiación ultravioleta (UV). Otra estrategia para favorecer la degradación ha sido la obtención de copolímeros que contienen grupos carbonilo; también se han considerado alcoholes y ésteres insaturados, benzofenonas, dicetonas, polisobutileno y algunos grupos amino (Ammala *et al.*, 2011). El calcio, en forma de estearato de calcio, ha sido utilizado como estabilizante de pH y lubricante, y se han comprobado sus propiedades como agente prodegradante (Pablos *et al.*, 2010).

5.2 Degradación de plásticos

La Sociedad Americana para Pruebas y Materiales (ASTM) y la Organización Internacional de Normalización (ISO) definen la degradación como un proceso irreversible que comprende una o más etapas, que conduce a un cambio significativo de la estructura de un material, típicamente caracterizado por una pérdida de propiedades (por ejemplo, estructura, peso molecular, integridad o resistencia mecánica), fragmentación o las dos simultáneamente, como consecuencia de condiciones ambientales, que se desarrolla durante un periodo de tiempo (Krzan *et al.*, 2006). Por ejemplo, Jakubowicz *et al.*, (2006), estudiaron en condiciones controladas de laboratorio la degradación del PEBD y concluyeron que la humedad fue determinante en la velocidad de degradación.

La biodegradación, por su parte, es un proceso de degradación, en el cual los microorganismos tales como bacterias, hongos y algas inician y propagan el proceso de deterioro del material. En términos generales las diferentes etapas de biodegradación comprenden la biodeterioración, biofragmentación y asimilación; por lo que ellas se tienen que investigar y validar de manera específica debido a que son dependientes de las condiciones ambientales (Eubeler *et al.*, 2009).

Shah *et al.*, (2008), Corti *et al.*, (2010), consideran que la degradación del polímero resulta de la intervención factores ambientales, tales como luz, temperatura, presión, humedad, condiciones químicas y actividad biológica, que inducen cambios en las propiedades del polímero, alterando características mecánicas, eléctricas, separación de fases, craqueo, erosión, cambios ópticos y eléctricos provocando el deterioro de su funcionalidad. Estos cambios son consecuencia del rompimiento de enlaces químicos, hinchamiento, aparición de nuevas estructuras y nuevos grupos funcionales. Por lo tanto, la composición y la estructura del polímero, así como las condiciones ambientales en las que se encuentre son algunos factores a considerar para estudiar las transformaciones presentes en el proceso de degradación.

La velocidad de degradación de los plásticos en ambientes naturales es muy lenta debido a las particularidades de cada polímero y al ambiente que rodea dicho material. Algunos factores que determinan la reactividad y por tanto la degradación del plástico en general, y del PE en forma específica, son mencionados a continuación.

Efectos de la estructura

La degradación de un polímero depende de su estructura, en el caso del PE, es un polímero de alta masa molar (cientos a miles de Da), constituido por unidades uniformemente distribuidas de grupos metilo (-CH₂-), con hibridación sp³, en la que sus orbitales se disponen en forma de tetraedro. Las fuerzas que mantienen unidas las moléculas entre sí son de tipo London, que hacen al material flexible y con temperaturas de fusión relativamente bajas (Chandra y Rustgi, 1998).

Estudio de la biodegradabilidad y ecotoxicidad de plásticos oxodegradables

La fotooxidación del PE ocurre en la superficie del material, la difusión controla el ingreso del oxígeno a las zonas amorfas y es impedido en las zonas cristalinas. Las irregularidades en las cadenas, como ramificaciones, entrecruzamiento y copolimerización con pequeñas cantidades de otros monómeros, limitan la cristalinidad. Se ha encontrado que la cristalinidad aumenta debido posiblemente al recocido, a la oxidación, a la ruptura de cadenas restringidas en la región amorfa que posteriormente sufren cristalización (Pablos *et al.*, 2010).

La biodegradación del material depende del tamaño de las partículas poliméricas: masas molares elevadas impiden el ingreso de las moléculas a las células de los microorganismos, y por tanto la reacción con el sistema enzimático intracelular. Por otra parte, la difusión de agua y otras moléculas reactivas producidas por los microorganismos es limitada debido a que las moléculas de PE en el estado sólido estarán fuertemente alineadas formando estructuras cristalinas con alta hidrofobicidad. Además a los plásticos se les agregan aditivos, llamados estabilizadores, tales como antioxidantes, que ayudan a mantener las propiedades estructurales del material (Koutny *et al.*, 2006).

5.2.2 Factores abióticos

La luz, la temperatura, la humedad, presión, la actividad química y estrés mecánico, son factores que inciden en los cambios físicos y químicos de los polímeros, ocasionando daños en la funcionalidad del material, que se reflejan en la alteración de las propiedades mecánicas, ópticas y eléctricas. Como consecuencia de estos fenómenos la superficie del material tendrá rajaduras, grietas, erosión, cambios de color, derivados de la ruptura de enlaces y aparición de grupos funcionales en la cadena polimérica.

Fotodegradación

La *fotodegradación* de los polímeros necesita como agente activo la radiación UV o radiación de alta energía. La etapa de iniciación del proceso es lenta, pero la de propagación es rápida. La longitud de onda más perjudicial depende de los enlaces presentes y por ello es diferente para cada plástico (Singh y Sharma, 2008). En general, la radiación del UV cercano (290-400 nm) del espectro solar determina la vida de un polímero para aplicaciones de exteriores.

El mecanismo de fotooxidación del polímero puede ser tipo Norris I, cuando el polímero se transforma por fotoionización y rompimiento de la cadena, o Norris II (Lucas *et al.*, 2008; Tyler, 2015). La figura 5.4 muestra los mecanismos implicados. La fotooxidación (también la termodegradación) da lugar a la formación de hidroperóxidos, sustancias inestables a la luz y al calor que se descomponen en radicales libres que participan en procesos de reacción en cadena. Los grupos ceto indican la oxidación de la cadena, son fotosensibles y sufren degradación Norris I o Norris II.

El mecanismo de la fotooxidación está influenciado por los grupos y/o impurezas dentro del polímero (ceto, peróxidos, hidroperóxidos, metales traza), que pueden absorber los cuantos de

Estudio de la biodegradabilidad y ecotoxicidad de plásticos oxodegradables

eficiente y puede ser monitoreado por mediciones de la masa molecular, cambios de coloración en la superficie del material, esfuerzo a la tensión, estimación de la cristalinidad a través de difracción de rayos X, técnicas espectroscópicas como infrarrojo con transformadas de Fourier (FTIR) y medición de propiedades térmicas como la temperatura de transición vítrea (T_g), entre otras.

Termodegradación

La *degradación oxidativa térmica*, por su parte, requiere como agente activo temperaturas superiores a la temperatura ambiente y presencia de oxígeno. La velocidad de degradación es rápida. Cuando se inicia la incubación térmica se produce una disminución de las propiedades mecánicas debido a que disminuye la concentración de cadenas de alta masa molar (responsables en su mayoría de las propiedades mecánicas) como resultado de la ruptura de la cadena (Chandra y Rustgi, 1998; Beyler y Hirschler, 2002).

La degradación térmica se produce por reacción de despolimerización, la cual no necesita ser iniciada en el extremo de la cadena; las imperfecciones de la cadena y los enlaces lábiles son iniciadores del proceso. El mecanismo de degradación térmica consiste en dos reacciones diferentes, la primera es la ruptura de enlaces, lo cual produce disminución de la masa molar; la segunda es la ruptura de un enlace C-C del extremo de la cadena, generando productos volátiles. Así mismo, durante el envejecimiento termo-oxidativo, el calor y el oxígeno dan comienzo a reacciones de radicales libres, los cuales contribuyen a la degradación del polímero (Chandra y Rustgi, 1998; Beyler y Hirschler, 2002).

En el caso de las poliolefinas, la estabilidad térmica está fuertemente afectada por entrecruzamientos, siendo las cadenas de polímeros lineales más estables que las entrecruzadas; además se ha encontrado que los cambios en el peso molecular a bajas temperaturas se deben a rompimiento de enlaces débiles de heteroátomos como el oxígeno obtenido por impurezas, mientras que a altas temperaturas el cambio en el peso molecular se debe a rotura de enlaces en carbono terciario o enlaces carbono-carbono en la posición beta al carbono terciario (Beyler y Hirschler, 2002).

La calorimetría diferencial de barrido puede ser usada para determinar las transiciones térmicas y de igual forma las técnicas que son utilizadas para observar foto degradación son útiles para determinar termodegradación.

Shah *et al.*, (2008), indican que la degradación térmica y la fotodegradación son similares y se clasifican como degradación oxidativa. La diferencia entre ellas radica en la secuencia de los pasos que conducen a la iniciación del ciclo de autooxidación, además, en la oxidación térmica las reacciones térmicas ocurren en toda la masa del polímero, mientras que la fotooxidación es un fenómeno de superficie.

Degradación química.

Estudio de la biodegradabilidad y ecotoxicidad de plásticos oxodegradables

La descomposición química de un polímero se relaciona con las reacciones que pueden ocurrir con los átomos de la cadena principal y los átomos de las cadenas laterales. Los enlaces de la cadena principal pueden romperse ocasionando la disminución de su masa molecular y generando sustancias volátiles de bajo peso molecular, o puede sufrir entrecruzamientos; las reacciones de cadenas laterales o sustituyentes pueden ocasionar eliminación de cadenas laterales, ocasionando insaturación de la cadena principal, formación de volátiles y entrecruzamientos, o puede ocurrir ciclación de la cadena lateral (Beyler y Hirschler, 2002; Pinheiro *et al.*, 2006). La degradación química, en un sentido más preciso se refiere a la interacción de sustancias con el polímero, tales como solventes, ácidos, y bases.

Los contaminantes ambientales atmosféricos y agroquímicos pueden interactuar con los polímeros e inducir cambios en los mismos. La hidrólisis es una forma de interacción de los plásticos con el medio. Si la cadena posee grupos hidrosolubles (ésteres, alcoholes, cetonas, amidas, ácidos carboxílicos, anhídridos, amino, amida) podrá sufrir degradación química, siendo dependiente de parámetros como el pH, tiempo de exposición, cristalinidad y actividad del agua. La hidrólisis y la oxidación son más activas en las regiones amorfas, dado que en marcos moleculares organizados se impide la difusión del agua y del oxígeno, consecuentemente la degradación química; mientras que las regiones amorfas facilitan la difusión lo cual mejora la degradación (Lucas *et al.*, 2008). El ataque de ácidos clorhídrico y sulfúrico, o de bases fuertes como hidróxido de sodio, favorece la degradación (Jung *et al.*, 2006).

La degradación enzimática es un proceso químico. Las enzimas responsables de degradación generalmente son oxidoreductasas, transferasas, liasas, isomerasas, hidrolasas que pueden producir biofragmentación y están involucradas en reacciones de despolimerización (Ammala *et al.*, 2011; Lucas *et al.*, 2008). Algunas de estas enzimas requieren la presencia de cofactores, tales como cationes de metales y coenzimas, que son sintetizados por los microorganismos y son específicos para cada tipo de ruptura de enlaces; la acción enzimática de las depolimerasas puede ser intra o extracelular (Gu *et al.*, 2000).

Degradación mecánica

Es otro factor abiótico importante de degradación, producida en general por factores ambientales (turbulencia del aire, del agua, presión de nieve, daños causados por organismos, envejecimiento por la carga, por instalación). En condiciones de campo, productos químicos, temperatura y otros factores climáticos podrían ser concomitantes con los esfuerzos mecánicos que inciden en el proceso de degradación (Briassoulis, 2006; Kyrikou *et al.*, 2011).

5.2.3 Factores bióticos

La biodegradación es un proceso de degradación en el cual los microorganismos tales como bacterias, hongos y algas inician y propagan el proceso de deterioro del material. Para que un

Estudio de la biodegradabilidad y ecotoxicidad de plásticos oxodegradables

polímero se llame biodegradable es importante que las fracciones de despolimerización sean asimiladas y completamente mineralizadas a dióxido de carbono o metano y agua.

En términos de la norma ASTM D 883-12, un plástico biodegradable es un plástico en el que la degradación resulta de la acción de microorganismos naturales tales como bacterias, hongos y algas. Esta biodegradación puede ser el resultado de la actividad enzimática celular, así como de las reacciones químicas que se pueden producir a nivel local por debajo de una adhesión celular a una superficie polimérica, o debido a la presencia de algunos compuestos no enzimáticos (ácidos liberados, por ejemplo).

Es posible la combinación de factores abióticos y bióticos. Las dos etapas (abiótica y biótica), pueden o no ocurrir simultáneamente (Roy, *et al.*, 2008). Se ha descrito que en la primera etapa, el oxígeno molecular se incorpora al esqueleto del polímero dando lugar a nuevos grupos funcionales (éter, alcohol, ceto, aldehído, carboxílico, éster), esa funcionalidad da lugar a cambios en la reactividad permitiendo el rompimiento de la macromolécula a moléculas más pequeñas. La hidrofiliidad ahora presente permite la acción de microorganismos, dando origen a la bioasimilación para formar dióxido de carbono, agua y biomasa, este proceso constituye la segunda etapa. El mecanismo de las reacciones de oxidación del PE, ha sido ampliamente ilustrado (Ammala *et al.*, 2011; Thomas *et al.*, 2012; Wiles y Scott, 2005).

La forma como se describe la influencia de los microorganismos en el deterioro de los materiales plásticos es observada a través de procesos de biodeterioro, biofragmentación y bioasimilación.

Biodeterioro

Es una degradación superficial que modifica las propiedades fisicoquímicas del material como consecuencia de la actividad mecánica, química y enzimática de los microbios, sobre o dentro de la superficie del material (Gu, 2003; Lucas *et al.*, 2008). Se mide, en primera instancia, por caracterización de la superficie a partir de la aparición de huevos, rugosidad y pérdida de brillo. Una segunda forma de evaluar el biodeterioro es medir la pérdida de masa del material o los cambios en las propiedades reológicas del polímero, o a través de la identificación de productos de formación derivados de su actividad (Lucas *et al.*, 2008).

Biofragmentación

Es un proceso de rotura de la macromolécula a oligómeros y monómeros, de tal forma que puedan atravesar la membrana citoplásmica de los microorganismos y ser mineralizados. Los microorganismos llevan a cabo este proceso por vía enzimática o por formación de radicales libres. La vía enzimática utiliza oxidoreductasas, hidrolasas, lipasas y esterasas, entre otras enzimas, muy específicas para cada parte activa del sustrato. En el caso del polietileno existen reportes de enzimas con actividad biodegradadora (Iiyoshi 1998), sin embargo existe controversia respecto al tema.

Estudio de la biodegradabilidad y ecotoxicidad de plásticos oxodegradables

Bioasimilación

Es un proceso que depende de la capacidad de los microorganismos para adaptarse a condiciones aerobias o anaerobias. Los microorganismos consiguen energía, nutrientes y electrones para su proceso normal de desarrollo como consecuencia de su interacción con los productos derivados de los plásticos y producen moléculas pequeñas y nuevas células. Las moléculas mineralizadas no representan, en general, peligro de ecotoxicidad, mientras que las moléculas excretadas o transformadas podrían tener riesgos de ecotoxicidad (Lucas *et al.*, 2008). La bioasimilación generalmente se mide por métodos respirométricos.

5.2.4 Técnicas analíticas para evaluación de la degradación de plásticos

La degradación de los plásticos se puede estudiar utilizando diferentes técnicas, algunas generales y otras específicas. En los apartados siguientes, se hará una descripción breve de las técnicas analíticas utilizadas.

Inspección visual. Se puede hacer en casi todas las pruebas. Se utiliza para observar los cambios que sufre la superficie del plástico como consecuencia de la degradación del polímero. Los efectos incluyen rugosidad, formación de agujeros y grietas, fragmentación, así como los cambios en la coloración de los materiales y formación de biopelícula (Lucas *et al.*, 2008; Shah *et al.*, 2008).

Pérdida de masa. Es una prueba directa de degradación e indirecta de biodegradación, aunque pueden generarse errores por la adhesión de sustancias en la superficie de las muestras plásticas.

Cambio en las propiedades mecánicas. Las propiedades mecánicas de un polímero dependen fundamentalmente de su estructura, composición y condiciones de procesado. En general, la resistencia a la tracción es muy sensible a los cambios de la masa molar del material y se toma como un indicador de degradación. En la despolimerización inducida por enzimas, la pérdida de masa por procesos abióticos (el material se erosiona superficialmente), produce alteraciones en la superficie del material y esto se traduce en cambio de las propiedades mecánicas. Éstas se ven alteradas, sin embargo las masas molares no cambian significativamente porque hay procesos de disolución.

Disminución de la masa molar. La pérdida de masa molecular y los cambios en la distribución de la masa molecular se han tomado como evidencias de degradación del material e influyen directamente en las propiedades del material (Singh y Sharma, 2008).

Uso de marcadores isotópicos. Es una técnica muy confiable, se desarrolla en condiciones controladas; su desventaja es el costo y a disponibilidad. Consiste en disponer de materiales de ensayo marcados con ^{14}C aleatoriamente distribuido y la cantidad de dióxido de ^{14}C evolucionada se mide utilizando un contador de centelleo (Sharabi y Bartha, 1993). Este método puede utilizarse para evaluar biodegradación.

Estudio de la biodegradabilidad y ecotoxicidad de plásticos oxodegradables

Medición de formación de dióxido de carbono o consumo de oxígeno. La medición de dióxido de carbono se realiza a través de una reacción ácido-base o de la utilización de técnicas cromatográficas, generalmente mediante técnicas respirométricas. Es una evaluación específica para biodegradación.

Degradación enzimática. Es un proceso de hidrólisis que comprende la unión de la enzima al polímero (sustrato) y luego cataliza la ruptura hidrolítica. El ensayo de la actividad enzimática se monitorea a través de la medición de la oxidación de una sustancia conocida (un alcohol, por ejemplo), además se evalúan propiedades del polímero, por ejemplo, porcentaje de elongación a la ruptura (Iiyoshi *et al.*, 1998).

Prueba de zona clara. Consiste en poner en un agar el plástico finamente dividido y luego inocular con microorganismos. La formación de un halo claro alrededor de las colonias es indicativo de la capacidad de los microbios de degradar el material.

Microscopía electrónica de barrido (SEM). Informa sobre la topografía del material. Se utiliza para mostrar detalles de destrucción de los polímeros y de la unión de los microorganismos a su superficie.

Espectroscopía de infrarrojo con transformada de Fourier. Permite identificar bandas características para cada grupo funcional. Específicamente en la degradación del PE, se usa el índice de carbonilo grupos cetona y éster, y el índice de vinilo como prueba para indicar la oxidación.

Para los productos de degradación pueden utilizarse técnicas de identificación y cuantificación, tales como cromatografía líquida y de gases, así como la espectrometría de masas.

5.2.5 Métodos estandarizados para evaluación de la biodegradación de plásticos

Diferentes ensayos han sido utilizados para determinar la biodegradación de materiales poliméricos, con los cuales se ha demostrado que tanto la composición química como el ambiente determinan la biodegradabilidad. A este respecto, entidades internacionales como la Organización Internacional de Normalización, ISO, la Sociedad Americana para Pruebas y Materiales, ASTM Internacional, el Comité Europeo de Normalización (CEN), las Normas Industriales Japonesas (JIS), la Organización para la Cooperación y el Desarrollo Económico (OCDE), han generado métodos estandarizados para probar la biodegradación, tanto para medios sólidos como líquidos (Ammala *et al.*, 2011; Eubeler *et al.*, 2009). Muchas de estos estándares no han sido diseñados originalmente para evaluar la degradación de los polímeros, sino que han sido adaptadas, por tanto se debe considerar las propiedades de los polímeros (por ejemplo, solubilidad, tamaño y estructura molecular) y demás parámetros fisicoquímicos. Además, los procedimientos analíticos deben ser abordados de manera individual en función

Estudio de la biodegradabilidad y ecotoxicidad de plásticos oxodegradables

del polímero y por tanto las pruebas son “particularizadas” en función de las cuestiones de la investigación.

El principio de los métodos para determinar la biodegradabilidad de una sustancia consiste en exponer dicha sustancia a una población mixta de microorganismos ambientalmente representativa, y medir los cambios producidos como consecuencia de la actividad de estos microorganismos (Cardinale *et al.*, 1996).

Para el caso de la presente investigación, se utiliza como referencia los estándares internacionales que definen las características y los métodos de prueba que deben tener los plásticos en ambientes marinos:

- ASTM D6691-17: Método de prueba estándar para determinar la biodegradación aeróbica de los materiales plásticos en el medio marino por un consorcio definido microbiano;
- ISO 14851.1999: Determinación de la biodegradabilidad aerobia última de los materiales plásticos en medio acuoso, método por medición de la cantidad de dióxido de carbono producida”
- ISO 14851.1999: Determinación de la biodegradabilidad aerobia última de materiales plásticos en un medio acuoso - Método mediante la medición de la demanda de oxígeno en un respirómetro cerrado.

Otras normas relativas a los métodos de prueba de degradación de plásticos se enlistan en la tabla 5.1.

Tabla 5.1 Estándares internacionales para el análisis de la degradación de materiales plásticos en diferentes condiciones.

Procesos	Norma	Denominación	Origen
COMPOSTABILIDAD	EN 14855-2005	Determinación de la biodegradabilidad final aerobia y desintegración de materiales plásticos en condiciones controladas de compostaje	Unión Europea
	ASTM D5338 - 11	Método de ensayo para determinar biodegradación aerobia de materiales plásticos bajo condiciones controladas de compostaje, incorporando temperaturas termófilas	ASTM International
	ASTM D6400-12	Especificación estándar para el etiquetado de plásticos para ser compostados en forma aerobia en instalaciones municipales o industriales	ASTM International
	EN 13432-2001	Envases y embalajes. Requisitos de los envases y	Unión Europea

Estudio de la biodegradabilidad y ecotoxicidad de plásticos oxodegradables

		embalajes valorizables mediante compostaje y biodegradación. Método de ensayo y criterios de evaluación para la aceptación final del envase o embalaje.	
--	--	---	--

Estudio de la biodegradabilidad y ecotoxicidad de plásticos oxodegradables

Continúa Tabla 5.1 Estándares internacionales para el análisis de la degradación de materiales plásticos en diferentes condiciones.

Procesos	Norma	Denominación	Origen
FOTODEGRADACIÓN	ASTM D 5208-14	Exposición de plásticos a radiación UV	ASTM Internacional
	UNE 53104-86	Plásticos. Envejecimiento artificial acelerado de materiales plásticos. Equipo basado en lámparas fluorescentes.	Unión Europea
OXIDACIÓN/ BIODEGRADACIÓN	ASTM D6954-04(2013)	Guía estándar para exponer y analizar plásticos que se degradan en el ambiente mediante una combinación de oxidación y biodegradación	ASTM Internacional
	ISO 15314:2004	Guía para la determinación de la biodegradabilidad en ambiente marino.	Estándares ISO
	ASTM D5210-07	Biodegradación anaerobia de materiales plásticos en presencia de lodos residuales municipales.	ASTM Internacional
	ASTM D5526-12	Métodos de ensayo de biodegradación anaerobia de materiales plásticos en condiciones aceleradas de relleno sanitario.	ASTM Internacional
	ASTM D5988-12	Biodegradación aerobia en suelos de materiales plásticos o residuos plásticos después del compostaje.	ASTM Internacional
	ASTM D6691-09	Método de prueba estándar para determinar la biodegradación aeróbica de materiales plásticos en el medio marino por un consorcio microbiano definido o inóculo de agua de mar natural.	ASTM Internacional
	ASTM D6692-01	Método de prueba estándar para determinar la biodegradabilidad de materiales plásticos poliméricos radio marcados en agua de mar.	ASTM Internacional
	BS 8472-2011	Método para evaluar oxo-biodegradación y fito-toxicidad de residuos plásticos en condiciones controladas de laboratorio.	Norma inglesa
	ISO 14852-1999	Determinación de la biodegradabilidad aeróbica final de materiales plásticos en un medio acuoso - Método por análisis de dióxido de carbono formado	NORMA ISO
	OCDE 301-1992	Guía de prueba de biodegradabilidad inmediata de sustancias químicas.	OCDE

Fuente: Elaboración propia

Los métodos pueden producir resultados diferentes, dependiendo de las particularidades de cada ensayo. Sin embargo, muchos métodos se basan en sistemas respirométricos, que son dispositivos utilizados para monitorear y medir la actividad respiratoria de organismos vivos centrándose en el consumo de oxígeno (O₂), la evolución de dióxido de carbono (CO₂) o ambos (Kijchavengkul *et al.*, 2006). Durante la biodegradación aerobia, el carbono en las

Estudio de la biodegradabilidad y ecotoxicidad de plásticos oxodegradables

moléculas del polímero se convierte en nuevas células, agua, residuos de carbono y dióxido de carbono, según la ecuación 5.1 (Reuschenbach *et al.*, 2003; Swisher, 1987):



Para pruebas respirométricas se deben considerar los principales factores que inciden en la biodegradación. Estos son la estructura del polímero (masa molecular, morfología, estructura química) y las condiciones del medio de biodegradación (aerobio o anaerobio), tales como la temperatura, los nutrientes, humedad, pH, entre otros; factores (Grima *et al.*, 2000; Kijchavengkul *et al.*, 2006).

5.3 Efectos de los plásticos en ambientes acuáticos

Es innegable el impacto que generan los residuos plásticos en los ecosistemas, una amplia literatura ha sido desarrollada desde el reconocimiento de las interacciones de la "basura" marina y los organismos, demostrada por Kenyon y Kridler en 1969 (citado por Bergmann *et al.*, 2015), hasta estudios recientes realizados en la segunda década del siglo XXI (Gall y Thompson, 2015; Gregory, 2009; Thompson *et al.*, 2009b).

Múltiples causas son las responsables del impacto de los plásticos sobre el planeta: sistemas inadecuados de tratamiento y derrames de agua residuales, industrias procesadoras de plásticos, uso de playas para la recreación, industria pesquera, turismo, vertido ilegal de residuos industriales y domésticos, incultura ciudadana, deficiente gestión de rellenos sanitarios, acción del aire y la lluvia. Esta situación ha hecho que los plásticos se encuentren distribuidos en todo tipo de ecosistemas; de hecho, estos materiales se han encontrado en depósitos sedimentarios y pueden ser considerados como la huella o indicador de la presencia humana en la tierra (Zalasiewicz *et al.*, 2016).

Los plásticos han enrarecido los ecosistemas terrestres y marinos y los peligros asociados con los desechos plásticos incluyen componentes físicos (fragmentos de diferentes tamaños de PEBD, PEAD, PVC, etc.), ingredientes químicos (aditivos y otros contaminantes de diferente origen) y productos químicos ambientales absorbidos sobre su superficie (Johnston *et al.*, 2010). Se han desarrollado modelos que indican que los mesoplásticos están más cercanos a las costas y forman los microplásticos que se encuentran en alta mar (Isobe *et al.*, 2014).

La combinación de basura marina con otros factores de estrés antropogénico puede producir efectos sobre la diversidad de las especies y los hábitats marinos. Investigadores consideran que la alteración de las propiedades térmicas de los sedimentos podría tener consecuencias importantes, por ejemplo, en el caso de los huevos de las tortugas marinas cuyo sexo es dependiente de la temperatura de incubación (Gall y Thompson, 2015). La acumulación de desechos plásticos ha presentado un nuevo hábitat marino donde se producen interacciones

Estudio de la biodegradabilidad y ecotoxicidad de plásticos oxodegradables

biológicas, reacciones entre partículas y tejidos, intracelular como extracelular. Este nuevo hábitat o plastisfera y su impacto ambiental sigue siendo área emergente de investigación.

Los plásticos que se encuentran en entornos marinos pueden estar en forma de macroplásticos, microplásticos y nanoplásticos. Los macroplásticos son residuos generados por el hombre que han llegado a las diferentes partes del planeta en forma accidental o deliberada. Los microplásticos se encuentran en forma de partículas de polímeros con diámetro inferior a 5 mm, originados por la erosión y fragmentación de macroplásticos residuales o por la liberación directa en forma de gránulos (pellets) y polvos de preproducción, de partículas de polímeros en productos de cuidado personal, medicamentos y otros productos (Andrady, 2011; Blair y Quinn, 2017). Los nanoplásticos se encuentran también en forma de partículas que se derivan de los microplásticos, o son emitidas directamente a la naturaleza y tendrán un impacto diferente debido principalmente al tamaño y a su gran área superficial (Mattsson *et al.*, 2015), por tanto, se convierte en un área que necesita ser investigada.

El estudio de las dos primeras categorías ha sido el foco de atención en algunas latitudes, pero no es el caso de Colombia; estas partículas, que podrían generarse durante los procesos de degradación de los plásticos pueden actuar como agentes contaminantes (Cole *et al.*, 2011). Se discutirá en forma breve el impacto de los plásticos en ambientes acuosos.

5.3.1 Plásticos como portadores de compuestos emergentes

El Bisfenol A (BPA) y los ftalatos son sustancias que se encuentran en materiales de uso común en equipos médicos, juguetes, empaques de alimentos, cosméticos, perfumes, computadores y CD. (Andrady, 2011; Thompson *et al.*, 2009a). Aditivos plásticos como ftalatos, BPA y polibromados difenil éteres (PBDEs), podrían ser transferidos a los humanos directamente de los plásticos, por ejemplo, juguetes flexibles llevados a la boca por niños pequeños, indirectamente a través de la comida y la bebida que se empaqueta o cuando se transportan alimentos a través de tubos de plásticos que contienen estos aditivos (Wagner y Oehlmann 2009). La liberación de estas sustancias se debe a que no están enlazadas químicamente a la matriz polimérica y por tanto pueden lixiviarse (Cole *et al.*, 2011).

Por otra parte, investigaciones indican que los desechos plásticos pueden absorber los contaminantes orgánicos persistentes (COPs) presentes en el océano y pueden alcanzar niveles de concentración elevados. En el ambiente marino muchos plásticos absorben pesticidas, como el diclorodifeniltricloroetano (DDT) y sus metabolitos, policlorobifenilos (PCBs), hidrocarburos aromáticos policíclicos (HAPs), hexaclorociclohexano (HCH), alquil fenoles y BPA en cantidades en orden de ng.g^{-1} hasta $\mu\text{g.g}^{-1}$. Estas sustancias pueden causar efectos crónicos sobre la salud de los ecosistemas incluyendo al hombre. Los efectos más conocidos son la disrupción endocrina, cambios genéticos (mutagenicidad) y carcinogénesis en peces, aves y mamíferos (Thompson *et al.*, 2009a).

Estudio de la biodegradabilidad y ecotoxicidad de plásticos oxodegradables

Para evaluar en el océano, las relaciones entre el plástico consumido y contaminantes orgánicos, Rochman *et al.*, (2013) suponen la presencia de un coctel de contaminantes incluyendo a los plásticos, a sustancias bioacumulativas, a persistentes y tóxicas (PBTs) y a metales. Sus resultados indican que PEAD, PEBD, PP, son los materiales que más absorbieron contaminantes (PCBs, PBDEs y HAPs), por lo que sugiere que los productos elaborados de estos polímeros suponen un mayor riesgo para la vida marina (Rochman *et al.*, 2013). Se ha sugerido por diferentes investigadores que los microplásticos tienen una alta capacidad de absorción de los COPs y por tanto juegan un papel importante en su destino y transporte (Avio *et al.*, 2016; Lee *et al.*, 2014; Setälä *et al.*, 2014).

5.3.2 Plásticos como vectores de microorganismos

Las superficies de los plásticos contribuyen al transporte de organismos, incluyendo especies invasoras y perjudiciales, por cuanto pueden formar biopelículas sobre la superficie, además pueden ofrecer un nicho protector capaz de soportar una diversidad de microorganismos, conocida hoy día como "plastisfera" (De Tender *et al.*, 2017; Osborn y Stojkovic, 2014; Zettler *et al.*, 2013).

La superficie dura de los plásticos proporciona un ambiente ideal para colonizadores microbianos oportunistas para formar biopelículas. Su carácter hidrofóbico permite la colonización microbiana, además su tiempo de vida es más largo que el de la mayoría de materiales naturales como la celulosa. Esta comunidad es diversa de heterótrofos, autótrofos, depredadores y simbioses, además podría actuar como un vector importante para la persistencia y propagación de patógenos, organismos indicadores fecales y especies nocivas de floración de algas (Lippsett, 2013; Zettler *et al.*, 2013). Se ha propuesto que los taxones microbianos de vida libre exhiben patrones biogeográficos (Azovsky *et al.*, 2016). Adicionalmente, los plásticos representan un nuevo modo de transporte que actúa como vía para trasladar microorganismos nocivos como el *Vibrio cholerae*, que produce cólera y enfermedades gastrointestinales (Lippsett, 2013).

En un estudio se demostró que en promedio las bolsas plásticas biodegradables son colonizadas cinco veces más por microorganismos aerobios y ocho veces más por microorganismos anaerobios que las bolsas de polietileno convencional, a pesar de que ninguna de las bolsas mostró signos de deterioro (Nauendorf *et al.*, 2016). Otros investigadores han reportado diferentes microorganismos en los plásticos estudiados (Sudhakar *et al.*, 2007; Artham *et al.*, 2009; Muthukumar *et al.*, 2014).

La formación de biopelículas en los plásticos ha sido ampliamente estudiada en términos de los efectos negativos potenciales sobre diferentes materiales (Gu, 2007), teniendo en cuenta su papel en el desempeño global de nutrientes y energía. Utilizando microscopía electrónica de barrido y secuenciación de genes, los científicos han encontrado más de mil tipos de células bacterianas en muestras de plásticos (Salazar y Sunagawa, 2017).

Estudio de la biodegradabilidad y ecotoxicidad de plásticos oxodegradables

5.3.3 Enredos e ingesta de plásticos

Se han detectado enredos con residuos plásticos en focas monje y otros animales salvajes (McIntosh *et al.*, 2015). Se ha documentado, además, la ingesta de partículas y fibras de microplásticos por parte de animales terrestres y acuáticos (Barnes *et al.*, 2009; Steer *et al.*, 2017; Zhao *et al.*, 2016).

En un estudio realizado en el tracto gastrointestinal de peces se encontró que en el 5.5% de las especies muestreadas presentaban plásticos, con predominio del polietileno y de microplásticos, con valores cercanos a 74% (Rummel *et al.*, 2016). En este mismo sentido Avio *et al.*, (2016) comentan que además de la ingesta, los enredos provocados y la acumulación de escombros de plásticos en organismos plantónicos, estos materiales pasan a las redes de alimentos acarreando consecuencias negativas sobre el valor nutricional de la dieta y daños físicos. Además de datos relativos a la ingesta de materiales plásticos para diferentes especies en tierra y agua, se suma la preocupación de la ingesta de estos materiales por parte de los humanos. En este sentido se ha informado que aún no existen protocolos para la identificación y cuantificación de nanoplásticos (tamaño 0.001-0.1 μm) presentes en los alimentos, especialmente cuando estos alimentos son de origen marino (Wallace *et al.*, 2016)

5.4 Ecotoxicidad

La toxicología es el estudio de las sustancias tóxicas o venenos. De acuerdo con la OMS la toxicología es:

"la disciplina que estudia los efectos nocivos de los agentes químicos y de los agentes físicos (agentes tóxicos) en los sistemas biológicos y que establece, además, la magnitud del daño en función de la exposición de los organismos vivos a dichos agentes. Se ocupa de la naturaleza y de los mecanismos de las lesiones y de la evaluación de los diversos cambios biológicos producidos por los agentes nocivos" (Cantú, 2000).

La toxicología ambiental es un campo de estudio interdisciplinario que examina los mecanismos biológicos y químicos subyacentes por los cuales las sustancias xenobióticas interactúan con la biósfera, incluyendo los seres humanos (Hanrahan, 2012). Truhaut en 1969, utilizó el término ecotoxicología por primera vez, para indicar una disciplina científica que puede describir los efectos tóxicos de diversos agentes químicos sobre los organismos vivos, con énfasis en las poblaciones y comunidades de los ecosistemas (Truhaut, 1977).

Un ecotoxicólogo puede estudiar el destino o el efecto de las sustancias tóxicas observando una molécula u observando la biósfera. El destino ambiental incluye el transporte, la transformación y degradación en el agua, suelo, aire, biota, sedimentos e interfaces (Sánchez-Bayo, 2011). Predecir el riesgo ecológico, exige conocer la magnitud y la dirección de los contaminantes, así como los efectos indirectos, los efectos subletales, la afectación de los

Estudio de la biodegradabilidad y ecotoxicidad de plásticos oxodegradables

diferentes factores abióticos, las interacciones entre las especies, los factores que regulan la estructura de la comunidad y de sus procesos.

Para evaluar el efecto de los contaminantes en los ecosistemas, se deben hacer mediciones en organismos, observando los efectos a la exposición de tóxicos y determinando las consecuencias biológicas sobre estos que consecuentemente afectarán la diversidad de los ecosistemas. Estas mediciones permiten conocer los procesos de absorción, transformación y eliminación de los tóxicos. Los efectos de los tóxicos sobre las poblaciones, pueden ser agudos o crónicos. Los efectos agudos se refieren a la entrada de un contaminante en concentraciones muy altas y de forma repentina, mientras que los efectos serán crónicos cuando el contaminante entra en forma regular o constante durante largo periodos de tiempo y sus concentraciones son bajas, los efectos son menos drásticos, menos evidentes y su evaluación es más compleja.

Uno de los ecosistemas más estudiados y de gran importancia es el ecosistema acuático, que comprende el régimen climático, el medio físico (temperatura, luz, flujos), el medio químico (oxígeno, nutrientes, carbono orgánico e inorgánico) en que interactúan los animales, plantas y microorganismos que viven en el agua, estas características son las que determinan la vida, la reproducción y la estructura de la red alimentaria (Zealand, 2000).

En los ecosistemas acuáticos, la ecotoxicología estudia la identidad, concentración y efectos de los productos químicos tóxicos en los entornos dulceacuícolas y marinos. Los primeros reportes de ecotoxicidad en sistemas acuáticos, datan del siglo XIX, consistían en ensayos de exposición de especies a tóxicos o efluentes durante cortos períodos de exposición (Hoffman *et al.*, 2003; Porter, 2008).

Los determinantes ambientales abióticos que influyen en los aspectos toxicológicos en ecosistemas marinos son fundamentalmente la temperatura, radiación no ionizante, fotoperiodo, estación del año, el pH, concentración de oxígeno, salinidad, dureza (Figura 5.5). Estos factores, particularmente la temperatura y la estacionalidad, deben ser tenidos en cuenta en la evaluación de los riesgos de los contaminantes xenobióticos porque pueden modificar la exposición y por tanto la toxicidad, es decir, los efectos subletales, letalidad y acumulación.

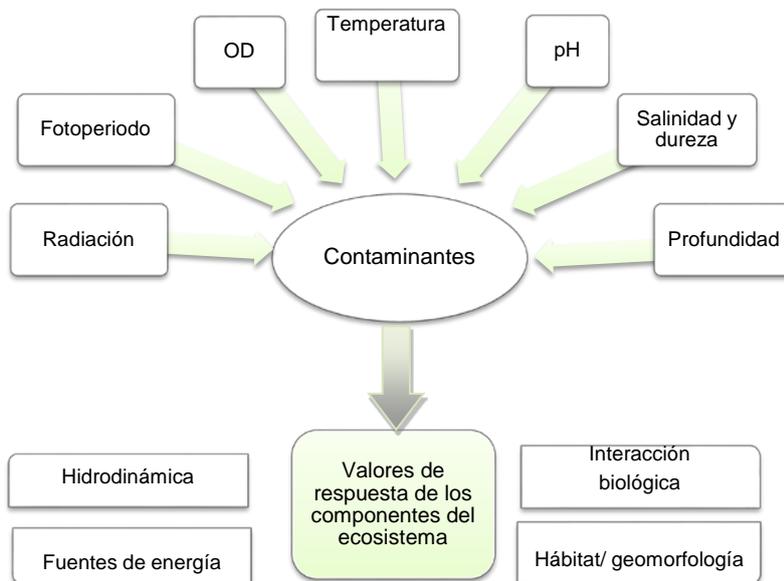
5.4.1 Evaluación de la ecotoxicidad

De manera tradicional, la toxicidad de una sustancia se mide con especies valorando, por ejemplo, el crecimiento, la reproducción y la mortalidad a escala de laboratorio. Sin embargo, estas condiciones son excepcionales dada la complejidad de las poblaciones y comunidades naturales. La extrapolación involucra incertidumbres, dado que en una situación real aparecen múltiples factores de estrés como mezcla de contaminantes y cambios de concentración. Las especies utilizadas son cultivadas en laboratorio y las condiciones de los ensayos son mantenidas constantes, por lo que no se tienen en cuenta parámetros en condiciones de los ambientes reales (Tarazona *et al.*, 2014). La figura 5.5, muestra los factores de interacción

Estudio de la biodegradabilidad y ecotoxicidad de plásticos oxodegradables

dentro de un sistema acuático, que difícilmente pueden ser reproducidas en su totalidad en un ambiente de condiciones controladas.

En la extrapolación, se han usado dos enfoques, uno implica tener en cuenta los puntos finales de la curva dosis-respuesta EC50 y así obtener factor llamado factor de seguridad o de aplicación, y con éste obtener un umbral por debajo del cual los efectos adversos se definen como poco probables (CPSE, concentración prevista sin efecto). El otro enfoque tiene en cuenta datos de respuesta disponibles como el EC50 y NOEC (concentración sin efecto observado, siglas en inglés), con ellos se construye una distribución de frecuencias de las especies afectadas, llamada distribución de sensibilidad de especies (DSS), los valores de concentración que no exceden la concentración crítica para el 90-95% de las especies consideradas se convierten en un factor protector para los ecosistemas y se usan en lugar del CPSE (Calow y Forbes, 2003; Colas *et al.*, 2014; Forbes *et al.*, 2001).



OD: Oxígeno disuelto

Figura 5.5 Principales factores de interacción físicos y naturales en un ecosistema acuático

(Adaptado de Hoffman *et al.*, 2003).

Los ensayos de ecotoxicidad, o exposición de organismos a una sustancia o mezcla de sustancias fisiológicamente activa, permiten el reconocimiento y la evaluación de los efectos de

Estudio de la biodegradabilidad y ecotoxicidad de plásticos oxodegradables

dichas sustancias o contaminantes sobre el conjunto de seres vivos de una región o biota. En la actualidad se han generado muchas metodologías de prueba, y de interpretación; se han creado modelos de ecotoxicidad en diferentes ambientes (acuáticos, vida silvestre, sedimentos, suelo, plantas, paisaje y algas). También han emergido el biomonitoreo y los biomarcadores como herramientas útiles en la vigilancia y el control de los ecosistemas y la observación de la incidencia de los tóxicos en forma crónica, subcrónica, aguda y subaguda.

El principio fundamental sobre el que se basan todos los ensayos de toxicidad, o bioensayos, es el reconocimiento de que la respuesta de los organismos vivos a la presencia (exposición) de los agentes tóxicos es dependiente de la dosis. Para realizar un bioensayo se tiene el xenobiótico o sustancia (activa fisiológicamente) a la cual se desea determinar su riesgo y peligrosidad y un grupo de organismos, un organismo o un tejido. El ensayo, en forma general, consiste en la exposición de grupos de organismos, a concentraciones conocidas del agente tóxico durante un tiempo específico.

El objetivo de los ensayos es conocer la toxicidad, los efectos y los mecanismos de acción de las sustancias xenobióticas sobre los organismos vivos, evaluar el riesgo de la exposición de las poblaciones y buscar las medidas de corrección y mitigación. En los sistemas acuáticos, las pruebas de ecotoxicidad incluyen la evaluación de los efectos sinérgicos, antagónicos y aditivos de todos los componentes químicos, físicos y biológicos de los organismos de prueba (Silva *et al.*, 2009).

Los organismos de prueba deben estar aclimatados a las condiciones del ensayo, ser saludables y mantenidos en condiciones constantes y ser sensibles al tóxico de interés. Siempre se dispone de un grupo de organismos de control, es decir, organismos que no serán sometidos a la presencia de la sustancia o material a ensayar. En un ensayo, se registran los efectos biológicos del tóxico sobre los organismos. Los parámetros de toxicidad más comúnmente empleados son la concentración letal media (CL_{50}), la concentración efectiva media (CE_{50}) y la concentración de inhibición media (CI_{50}).

En el caso de los ecosistemas acuáticos comúnmente es necesario hacer diferentes ensayos, idealmente a través de un productor primario (algas), un consumidor primario (artrópodo acuático), un consumidor secundario (peces) y un consumidor terciario (aves).

En general las pruebas de toxicidad aguda evalúan la supervivencia como una respuesta a la concentración del contaminante y proporcionan una estimación de la concentración por debajo de la cual no hay daños adversos (Adams y Rowland, 2004). Muchos organismos son utilizados para evaluar la toxicidad crónica en medio acuático, ejemplos de ella son: Diatomeas (*Asterionella*, *Frailaria*, *Merdion*, *etc.*); macro invertebrados bentónicos; *Salvelinus fontinalis* (trucha arco iris); *Daphnia magna*, *Ceriodaphnia dubia* (dafnias); *Lumbriculus variegatus* (oligoquetos), *Chironomus tentans* (mosquita); *Hyalella azteca* (anfípodo de agua dulce); *Brachydaniorerio* (el pez cebra) y *Americamysis bahia* (camarón mísido).

Estudio de la biodegradabilidad y ecotoxicidad de plásticos oxodegradables

En pruebas de toxicidad crónica se miden los efectos de las sustancias tóxicas a las especies acuáticas sobre una parte significativa del ciclo de vida del organismo, típicamente un décimo o más de su vida. Contrario a la toxicidad aguda, cuyo objetivo es medir supervivencia, la toxicidad crónica mide efectos subletales de los tóxicos sobre el ciclo de vida del organismo, es decir, en la reproducción, el crecimiento y el comportamiento como consecuencia de las perturbaciones fisiológicas y bioquímicas; la supervivencia se evalúa, pero no es el objeto de estudio.

Particularmente, las pruebas de toxicidad o bioensayos con algas son de corta duración, entre 24 a 96 horas, debido a la rapidez reproducción; varias generaciones se exponen el tiempo de duración del ensayo, por esta razón estos ensayos son de carácter crónico. La norma ISO 6341 (ISO 6341:2012, 2012), describe el bioensayo con *Daphnia magna*, para sustancias que bajo las condiciones del ensayo son solubles, se pueden mantener en suspensión o dispersas en el medio de efluentes de agua tratada o sin tratar. La tabla 5.2 muestra algunos estándares internacionales para medir la ecotoxicidad.

La OCDE ha publicado la guía de ensayo 201, "Prueba de inhibición del crecimiento de algas y cianobacterias en agua dulce (OCDE.201, 2011), un ensayo que determina la influencia de productos químicos sobre la inhibición del crecimiento de micro-algas y cianobacterias de agua dulce. La respuesta esperada es la reducción del crecimiento en una serie de cultivos de algas, cada uno con sus respectivas réplicas, cada ensayo con concentraciones diferentes del producto químico de interés. El propósito de la prueba es determinar los efectos sobre el crecimiento del microorganismo, teniendo en cuenta que éste crece exponencialmente. El ensayo tiene una duración de 72 horas; la evaluación del resultado se hace teniendo en cuenta el crecimiento promedio de los cultivos comparativamente con el testigo, a quien se le permite el crecimiento exponencial. Todos los cultivos crecen, sin restricción, con nutrientes suficientes, aireación y con iluminación. La inhibición del crecimiento se evalúa midiendo la biomasa como una función del tiempo. El microorganismo de prueba para la investigación es la *Chlorella* sp, una microalga verde, productor primario que se desarrolla en ambientes acuáticos, y será tratado en el siguiente apartado.

Tabla 5.2 Estándares internacionales para evaluar ecotoxicidad.

ECOTOXICIDAD	ISO 6341:2012	Determinación de la inhibición de la movilidad de <i>Daphnia magna</i> Straus (Cladocera, Crustacea) – Pruebas de toxicidad aguda.	NORMA ISO
	OCDE 208-03	Pruebas para productos químicos	OCDE
	OCDE 201-2011	Alga de agua dulce y cianobacterias, prueba de inhibición del crecimiento	OCDE

Fuente: Elaboración propia

5.5 Microalgas en la ecotoxicología

Las microalgas son productores primarios, pertenecen un grupo grande y biodiverso de organismos autótrofos de crecimiento rápido. Pueden ser procariotas y eucariotas, contienen clorofila y otros pigmentos fotosintéticos que realizan fotosíntesis oxigénica y se encuentran tanto en agua dulce como agua de mar. Se considera que están en la base de la cadena trófica pues procesan el dióxido de carbono y además necesitan nitrógeno, fósforo, potasio, magnesio y otros elementos menores importantes en la función de sus cofactores enzimáticos. Las algas tienen diversas formas: unicelulares, filamentosas, parenquimatosas, pseudoparenquimatosas, coloniales, ramificadas, e incluso pueden tener células flageladas.

Las algas verdes constituyen el grupo más heterogéneo de protoctistas foto autótrofos que habitan la biósfera y muestran una enorme variabilidad amplia de la forma, tamaño y hábito. Como productores primarios tienen una importancia comparable a la de las selvas tropicales. Desde el punto de vista taxonómico constituyen un grupo parafilético, ya que probablemente tienen un ancestro común con las plantas, tienen el mismo tipo de pigmentos y producen el mismo tipo de hidratos de carbono durante la fotosíntesis que las plantas terrestres. La capacidad de las especies individuales en los recursos que explotan puede ser muy diferente, como en relación con la absorción de nutrientes, recolección de luz, y la resistencia al lavado. Las diferentes combinaciones de estos parámetros, que en los ecosistemas de aguas continentales pueden fluctuar fuertemente en escalas cortas de tiempo, dan lugar a una variedad de diversidad biológica asombrosamente alta (Naselli-Flores, 2009).

El estudio de aspectos relacionados con el comportamiento de las microalgas tiene ahora un marcado interés por las amplias aplicaciones que pueden ser objeto, desde su uso como fuentes de alimento, productos farmacéuticos, biocombustibles (Park, et al, 2011), biorremediación, en medicina y como indicadores de calidad ambiental.

5.5.1 Clasificación de las microalgas

Para fines prácticos, la división y la clase de algas se relacionan con el color, aunque también influyen en su clasificación la naturaleza química de los productos almacenados, la citología y la morfología, la presencia o ausencia de células flageladas, la estructura y productividad (Littler y Littler, 1980); el patrón y el curso de la mitosis (división nuclear); la división celular o citoquinesis; presencia o ausencia de retículo endoplasmático alrededor de los cloroplastos; y la clase de ciclo de vida que influye en la definición de la clase de alga (Naselli-Flores, 2009). Otras formas de clasificar las algas han sido diseñadas en la actualidad (Tabla 5.3), en la que se presentan la división, algunas características de las algas y función ambiental de estos microorganismos.

Estudio de la biodegradabilidad y ecotoxicidad de plásticos oxodegradables

Tabla 5.3 Clasificación de algas.

División	Características	Función ambiental	Referencias
<i>Diatomeas (Bacillariophyta)</i>	Su pared celular es silíceica. Se utilizan para monitorear las condiciones ecológicas históricas de los sedimentos, se acumulan en el fondo, formando "tierras de diatomea", aunque no tienen órgano locomotor, se movilizan debido a una respuesta a estímulos físicos y químicos.	Biondicadores en la reconstrucción de la calidad del agua y en problemas de acidificación de aguas superficiales.	(López <i>et al.</i> , 2009).
Rodofita (algas rojas)	Presentan ficobilina como pigmento principal, su pared celular contiene agar y carragenato, los cuales se utilizan en la industria alimentaria.	Desnitrificación biológica y neutralización para obtener agua potable.	(Villalobos <i>et al.</i> , 2007)
Dinoflagelados	La mayoría son unicelulares biflageladas. Poseen placas o teas constituidas por celulosa, responsables de las mareas rojas, se reproducen por bipartición.	Simbiosis con sistemas de arrecifes.	(Llorente y Cereceda, 2001)
Algas pardas	Se fijan a los sustratos mediante rizoides. Se utilizan como fertilizantes por su contenido de fibras, su pared celular está formada por alginato, el cual es utilizado en la industria textil y farmacológica.	Contribuyen a la retención de humedad y absorción de metales pesados.	(Chang <i>et al.</i> , 2002; Slawomir y Wilk-Wozniak, 2011)
Euglenoides	Habitán en ambientes con abundante materia orgánica en descomposición. Presentan variaciones en sus pigmentos, tienen como reserva de almacenamiento el paramylon, se reproducen asexualmente por división longitudinal, son heterótrofos facultativas.	Absorben metales pesados	(Slawomir y Wilk-Wozniak, 2011)

Fuente: Elaboración propia

En resumen, las principales diferencias de los grupos de algas hacen referencia al ciclo de vida, estructura celular, composición de pigmentos.

5.5.2 Requerimientos para el desarrollo de las microalgas

El crecimiento de las microalgas y la composición química están estrechamente vinculados con parámetros abióticos y bióticos. Entre los primeros están la luz (calidad y cantidad), temperatura, disponibilidad de dióxido de carbono, pH, nutrientes como nitrógeno y fósforo, oxígeno disuelto, iones (calcio, magnesio, cloruro, hierro, sulfato), además las sustancias xenobióticas. En los factores bióticos se tienen en cuenta bacterias, hongos, virus, otras especies de algas y organismos de orden superior. En el proceso de cultivo, además de los anteriores se tienen en cuenta factores de dilución, de mezcla, frecuencia de cosecha, adición de sustancias, tales como el bicarbonato. La homogenización a través de mezcla favorece la distribución celular, la transferencia de calor y de gases; y la turbulencia óptima permite el traslado de las células de zonas de oscuridad a zonas de luz, especialmente cuando los reactores son a gran escala, cuando la turbulencia es muy elevada puede ocasionar muerte de las algas por esfuerzos de tensión de corte (Eriksen, 2008).

5.5.2.1 Nutrientes

El crecimiento y la distribución de las algas en los ecosistemas están ligados a fuentes nutricionales, constituidos por sustancias de carácter orgánico e inorgánico. Dos clases de nutrientes, son necesarios: macronutrientes y micronutrientes.

Estudio de la biodegradabilidad y ecotoxicidad de plásticos oxodegradables

Macronutrientes: azufre, potasio, magnesio, calcio, nitrógeno y fósforo, para la mayoría de las microalgas; las diatomeas, además, necesitan una fuente de silicio. Se ha encontrado que una relación de carbono:nitrógeno:fósforo de 106:16:1, conserva apropiadamente los procesos fisiológicos de crecimiento (Lagus, 2009; Lagus *et al.*, 2007).

Micronutrientes: Walker (1954) encontró que por cada gramo de *Chlorella* sp seca se requieren un mínimo de 30 mg de hierro, 2,5 mg de manganeso y 4,5 mg de zinc. Sin embargo, se requieren cantidades muchos más grandes cuando en el medio hay presencia de EDTA (ácido etilendiaminotetracético), excepto el hierro. Otros elementos como calcio, hierro y cloro han sido considerados como elementos traza (Porter, 2008).

Nitrógeno. El nitrógeno es uno de los nutrientes importantes para el crecimiento y desarrollo de las células algales; forma parte fundamental de la formación de las proteínas, de los ácidos nucleicos y regula el contenido de lípidos (Park *et al.*, 2011). El contenido de nitrógeno de la biomasa puede variar de 1% a más del 10% y depende de la cantidad, la disponibilidad y el tipo de la fuente de nitrógeno; otros autores mencionan valores entre 7 y 20% del peso de la biomasa seca. El nitrógeno se suministra fundamentalmente en forma de nitratos; sin embargo, también se han utilizado otras sustancias, como urea y amoníaco. En estudios recientes se ha ensayado el uso de aguas residuales y residuos agrícolas como fuentes de nitrógeno (Markou y Georgakakis, 2011).

En agua dulce con alto contenido de oxígeno, la fuente de nitrógeno son los nitratos provenientes de procesos de oxidación de bacterias, también las sales de amonio están presentes; mientras que en aguas residuales otras formas de nitrógeno como, aminoácidos, ácido úrico, urea y amonio, estarán presentes. Todas las formas posibles de nitrógeno, desde el nitrógeno molecular, amonio, nitritos, nitratos y hasta el nitrógeno proveniente de los compuestos orgánicos es susceptible de ser utilizado como nutriente.

Si el nitrógeno está limitado se inhibe la formación de aminoácidos, limitando la traducción de ARNm y en consecuencia se reduce la síntesis de proteínas. También disminuye la eficiencia del fotosistema II (PSII), reduciendo así la fotosíntesis y también la tasa respiratoria (Barsanti Y Gualtieri, 2014). Algas nitrógeno heterótrofas tienen la capacidad de metabolizar compuestos de nitrógeno, tales como aminoácidos como fuente de energía y nutrientes, esto implica que la abundancia de este tipo de heterótrofos es un indicador de la presencia de compuestos orgánicos con nitrógeno (Porter, 2008).

Fósforo. Es un elemento muy importante en la generación de las células de las algas, es limitante y su valor es cerca del 1% del peso en seco de biomasa. Las algas usan la forma de ortofosfato (PO_4^{3-}) (Seale *et al.*, 1987).

El fósforo, como fosfatos, es otro nutriente importante, que junto con el nitrógeno estará presente en moléculas como el ATP, ARN y el ADN, o moléculas de la vida. A partir de la relación entre el nitrógeno y el fósforo, se puede inferir el estado nutricional de algas

Estudio de la biodegradabilidad y ecotoxicidad de plásticos oxodegradables

fitoplanctónicas, se ha encontrado que cuando hay deficiencia de fósforo, la relación, N: P es superior a 20 y cuando esta relación es inferior a 10 hay deficiencia de nitrógeno (Bulgakov y Levich, 1999).

Carbono, hidrógeno y oxígeno. La cantidad de hidrógeno y oxígeno no es crítica para el desarrollo y crecimiento de las algas. El carbono es fundamental, tiene tres funciones básicas: la respiración, como fuente de energía y materia prima para las nuevas células, por tanto es en fotosíntesis, crecimiento y reproducción de las algas (Berman-Frank, 1999). Las algas autótrofas requieren una fuente de carbono inorgánico, como dióxido de carbono, bicarbonato o carbonato; por su parte las algas heterotróficas requieren carbono en forma de acetato o glucosa. Las formas del carbono inorgánico son una función del pH, temperatura, y el contenido de nutrientes.

5.5.2.2 Luz

Las microalgas pueden tener metabolismo autótrofo, heterótrofo, mixotrófico o fotoheterótrofo y responden a cambios en las condiciones ambientales. Son autótrofas cuando su única fuente de energía es la energía luminosa, transformada a energía química mediante reacciones fotosintéticas. Las algas mixotróficas utilizan compuestos de carbono, dióxido de carbono y energía luminosa. Las algas fotoheterótrofas, necesitan luz para transformar los compuestos orgánicos y las algas heterotróficas utilizan compuestos de carbono como fuente de energía y de carbono (Contreras-Flores *et al.*, 2003; Mata *et al.*, 2010).

5.5.2.3 Temperatura

Es un parámetro físico importante, con marcada influencia en la evolución del fotosistema oxidoreductasa-plastoquinona agua (PSII), que incide en la disponibilidad y absorción de nutrientes. Está ligada a la fotoinhibición y la luz. Es un factor limitante para los cultivos de algas al aire libre. Muchas microalgas toleran temperaturas bajas hasta de 15 °C menores a su valor óptimo, pero si se excede el valor óptimo en 2-4 °C se puede ocasionar la pérdida de los cultivos (Mata *et al.*, 2010); sin embargo la temperatura varía según la especie. Los valores óptimos se encuentran entre 28 y 35 °C, La fotosíntesis está en gran medida determinada por la temperatura y por tanto incide en el metabolismo. En el caso de los océanos, por ejemplo, la mayor actividad metabólica se desarrolla con temperaturas entre 0 y 27 °C, siendo el rango óptimo entre 15 y 20 °C (Edding, 2006).

5.5.2.4 Salinidad

En sistemas abiertos o cerrados la salinidad es una variable que afecta el crecimiento y la composición de las microalgas, puede afectar la poliesperma y la supervivencia de los gametos. Los cambios de salinidad pueden producir estrés osmótico, por las sales y por cambios de las relaciones iónicas celulares, puesto que las membranas celulares son selectivas a los iones. En cultivos cerrados la salinidad es controlable, bien sea por adición de

Estudio de la biodegradabilidad y ecotoxicidad de plásticos oxodegradables

sales o por agregado de agua dulce. En cultivos mixotróficos y en condiciones axénicas la salinidad aumenta la producción de pigmentos (Moronta *et al.*, 2006).

5.5.2.5 Mezcla

La mezcla permite la homogenización y distribución de células, de calor, metabolitos, facilita la transferencia de gases y con ello regula el crecimiento de los cultivos. Cuando los cultivos son grandes, y teniendo en cuenta la especie presente, es deseable cierta turbulencia para promover la circulación desde zonas de oscuridad a zonas de luz (Markou y Georgakakis, 2011).

5.5.2.6 Presencia de contaminantes biológicos

Las principales especies contaminantes son los hongos, las levaduras, las bacterias y otras microalgas, y tanto sus metabolitos como las tasas de crecimiento pueden afectar el cultivo de interés. La competencia es determinada por presencia de nutrientes, la oligotrofia reduce la biomasa de productores primarios, pero aumenta la diversidad y disminuye la competencia. Algunas especies son capaces de coexistir si el nutriente limitante es diferente, pero esa presencia de herbívoros es un nuevo actor dentro del andamiaje de los productores primarios y afectará la incertidumbre sobre el final alcanzado, esos cambios en las comunidades termina también afectando el ecosistema (Rodrigo, 2007).

5.5.2.7 pH y dióxido de carbono

El pH está influenciado por factores tales como la alcalinidad, la producción de nuevas células algales, la composición iónica del medio y la posible adición automatizada de dióxido de carbono.

5.5.3 *Chlorella* sp

Chlorella sp es un alga microscópica, unicelular, esférica, con diámetro entre 2 y 10 micras. Su hábitat es el agua dulce y se encuentra presente en lagos y pantanos en el mundo entero. Su reproducción es asexual. Una característica importante de la *Chlorella* sp, es el alto contenido de clorofila, lo que potencia su capacidad fotosintética en comparación con las plantas superiores.

La taxonomía de la *Chlorella* sp es: Reino: Protoctista, División: Chlorophyta, Clase Chlorophyceae, Orden: Chlorococcales, Familia: Oocystaceae, Género: *Chlorella*, Especie: vulgaris, es la más conocida. La especie del presente trabajo se llamará *Chlorella* sp. La biomasa de la *Chlorella* sp, tiene porcentajes bajos de hidratos de carbono, comparado con el contenido de proteína y de lípidos con valores entre 9-20% (Takeda, 1988).

Este microorganismo pertenece al nivel trófico primero de la cadena alimenticia, y su perturbación puede causar efectos no deseados en los niveles más altos del ecosistema. La *Chlorella* sp es muy sensible a sustancias tóxicas (Ma *et al.*, 2004), a los cambios del entorno y siendo su ciclo de vida corto, se puede medir el impacto sobre varias generaciones. Además

Estudio de la biodegradabilidad y ecotoxicidad de plásticos oxodegradables

son microorganismos que se pueden cultivar fácilmente en el laboratorio a bajo costo, pues el control de su afectación fisiológica y biológica no necesita sistemas sofisticados, ni equipos costosos. Siendo un organismo unicelular, las pruebas de toxicidad son más fácilmente reproducibles, son robustas y confiables; adicionalmente es sensible a diferentes contaminantes (Tabla 5.4).

Estudio de la biodegradabilidad y ecotoxicidad de plásticos oxodegradables

Tabla 5.4 Estudios ecotoxicológicos utilizando *Chlorella* sp como organismo indicador.

Microrganismo bio-indicador	Contaminante estudiado	Referencias
<i>Chlorella vulgaris</i>	Concentraciones superiores a $1\mu\text{g.L}^{-1}$ de fenantreno, afecta negativamente el crecimiento.	Oteropaternina <i>et al.</i> , 2013.
<i>Chlorella</i> sp	Evaluación de toxicidad de materiales de geoingeniería (quitosano, almidón catiónico y mezcla de estos con suelos). Se demostró inhibición de crecimiento	Wang <i>et al.</i> , 2016
<i>Microcystis aeruginosa</i> comparada con <i>C. vulgaris</i>	Pentaclorofenol 1g/l no resulta ser tóxico para la <i>C.</i> , sin embargo sí lo es para <i>M. aeruginosa</i> .	de Morais <i>et al.</i> , 2014
<i>Chlorella vulgaris</i> , cultivada en diferentes medios	Se evaluó el efecto de micro y nanopartículas de titanato de bario sobre el crecimiento, viabilidad celular y actividad enzimática.	Polonini <i>et al.</i> , 2015
<i>Chlorella vulgaris</i> and <i>Dunaliella tertiolecta</i>	Nanopartículas de plata con tamaños de cerca de 50 nm ($0-10\text{ mg.L}^{-1}$). No se muestran efectos sobre la <i>Chlorella</i> . sp, y en la <i>Dunaliella tertiolecta</i> hay disminución en la producción de clorofila.	Oukarroum, <i>et al.</i> , 2012.
<i>Chlorella vulgaris</i> ; <i>Vibrio fischeri</i> ; <i>Daphnia magna</i> .	Dietanolamina (DEA). Mayor sensibilidad en <i>V. fischeri</i> y <i>daphnia magna</i> , seguido de <i>C. vulgaris</i> .	Zurita <i>et al.</i> , 2005

Fuente: Elaboración propia

Capítulo VI

METODOLOGÍA

6 METODOLOGÍA

Esta investigación se desarrolló en las instalaciones del laboratorio de Tecnologías Sustentables de la Universidad Autónoma Metropolitana, Unidad Azcapotzalco (México); laboratorio de Hidráulica y Ambiental de la Universidad del Norte (Colombia); laboratorio de Tecnología de Microalgas de la Universidad del Atlántico (Colombia); en la Marina de Puerto Velero, ubicada en el Caribe Colombiano (latitud 10° 55' 48" N y longitud 75° 03' 32"); en el río Magdalena en Colombia (Barrio Las Flores, departamento del Atlántico 10° 57' 42" latitud norte y 74° 46' 54" de longitud occidental).

El desarrollo experimental comprendió cuatro etapas:

- Etapa uno: selección de materiales, preparación y caracterización inicial de materiales a evaluar (PEAD convencional y oxodegradable); intemperización acelerada con radiación UV de una parte de los plásticos y caracterización.
- Etapa dos: exposición de los materiales en entornos naturales acuáticos de agua salada (mar) y agua dulce (río), evaluación de su degradación, así como identificación de microorganismos adheridos a las películas.
- Etapa tres: biodegradación de los plásticos en pruebas de laboratorio, mediante metodologías adaptadas de las normas internacionales para la evaluación de la degradación de películas plásticas en agua (ISO 14852:1999, ISO 14851:1999 o normas ASTM D6691 – 17).
- Etapa cuatro: evaluación de la ecotoxicidad de estos materiales con y sin oxidación previa, utilizando la especie *Chlorella* sp como indicadora de ecotoxicidad.

Finalmente se integraron los resultados obtenidos tanto en ambientes reales como en ambientes simulados o de laboratorio. El procedimiento experimental se ilustra en la figura 6.1.

Estudio de la biodegradabilidad y ecotoxicidad de plásticos oxodegradables

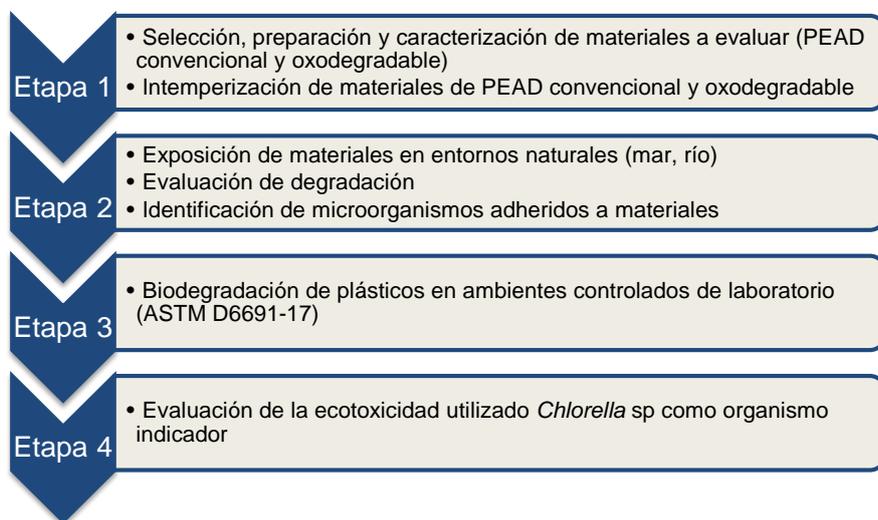


Figura 6.1 Esquema general de las etapas experimentales de la investigación.

6.1 Selección, preparación y caracterización de materiales

Los plásticos ensayados corresponden a bolsas tipo camiseta, cuyo propósito es transportar mercancías. Proviene de un proceso de producción en el cual variables como la temperatura, la presión, las materias primas utilizadas (agregado de materiales de reciclaje) pueden generar masas moleculares muy diferentes en las cadenas del polímero. La anchura de la distribución de los pesos moleculares influye notablemente en las propiedades de dicho material.

Para la caracterización se utilizan diferentes métodos, tales como espesor, calibre, densidad, propiedades mecánicas como el porcentaje de elongación a la ruptura. Desde el punto de vista químico se analizaron las principales bandas de absorción en ATR/FTIR, y el contenido de halógenos y metales (Fe, Co, Ni, Mn).

6.1.1 Selección de muestras plásticas

Las muestras de PEAD oxodegradable y PEAD convencional, fueron suministradas por una empresa mexicana que distribuye el aditivo prooxidante de la firma d2w®, producido por la compañía Symphony Environmental. Estos materiales también están disponibles en el mercado colombiano, pues son formulaciones definidas por los fabricantes de los aditivos. El componente activo de este aditivo es un estearato metálico, típicamente manganeso (Ammala *et al.*, 2011). La tabla 6.1 muestra las principales características de las películas plásticas utilizadas para la presente investigación.

Estudio de la biodegradabilidad y ecotoxicidad de plásticos oxodegradables

Tabla 6.1 Descripción de los plásticos utilizados en la presente investigación.

Parámetro	PEAD convencional	PEAD oxodegradable
Tipo de material	Bolsa tipo camiseta	Bolsa tipo camiseta
Apariencia	Bolsa opaca, estampada con pigmentos verdes	Bolsa opaca, estampada con pigmentos verdes.
Color	Opaco, sin color	Opaco, sin color
Olor	Sin olor aparente	Sin olor aparente
Marcas legibles	Sin marcas	" <i>oxo-biodegradable</i> "
Código de identificación	2	2
Otras características	Bolsa troquelada con fuelle	Bolsa troquelada con fuelle
Tamaño de la bolsa	36 cm x 18 cm x 5,5 cm (fuelle)	36 cm x 18 cm x 5,5 cm (fuelle)

6.1.2 Corte de las probetas

Los plásticos objeto de estudio se cortaron en pequeños trozos que en adelante se llamarán probetas. Las probetas para las pruebas fueron tomadas de cinco bolsas seleccionadas en forma aleatoria. La bolsa se desplegó y se cortó en bandas longitudinales, teniendo el cuidado de hacerlo siempre en la misma dirección, lo cual es coincidente con la dirección de extrusión. La temperatura de almacenamiento y corte de las probetas fue la temperatura ambiente de laboratorio, aproximadamente 20 °C. Todas las probetas se cortaron con una longitud de 150 mm y un ancho de 10 mm.

6.1.3 Caracterización inicial de las películas plásticas

Se determinaron las características iniciales de las muestras plásticas con el fin de contar con una línea base que permitiera evaluar la degradación.

Inspección visual

Se verificó inicialmente que las probetas plásticas no presentaran irregularidades. La formación de rugosidades, agujeros, grietas, fragmentación, formación de biopelícula y cambios de color

Estudio de la biodegradabilidad y ecotoxicidad de plásticos oxodegradables

fueron utilizados como indicadores de degradación y biodegradación de los plásticos (Shah *et al.*, 2008). Dichos efectos visuales se evaluaron con registro fotográfico y micro fotográfico.

Determinación de espesor

Se toman medidas a lo largo de la probeta, con un espacio entre medida y medida de aproximadamente de 30 mm. Para ello se utilizó el micrómetro que se muestra en la Figura 6.2. El valor del espesor se calculó como la media aritmética de los valores individuales medidos y se expresó en micrómetros.

Determinación de masa

Las muestras antes medidas, se utilizaron para medir la masa promedio. Se desarrollaron mediciones para el material, como fue descrito en la tabla 6.1, para ello se utilizó una balanza analítica modelo JT/AR120 con precisión de 0,1 mg.



Figura 6.2 Micrómetro.

Determinación de densidad

La densidad del material se determinó relacionando la masa y el volumen. El volumen se determinó multiplicando el área de cada probeta por el espesor.

6.1.3.1 Propiedades mecánicas iniciales del material

Algunas propiedades de los materiales, como la resistencia a la tracción, entendida como el máximo esfuerzo que un material puede resistir antes de su rotura por estiramiento, son útiles para identificación y caracterización. En este caso, para cada material se midió el porcentaje de elongación a la ruptura según norma ASTM D882. Para determinar esta propiedad se utilizó la máquina universal de ensayos a una velocidad de 100 mm.min⁻¹, a temperatura de aproximada de 20 °C. Debido a la elasticidad del material se tomaron probetas de 50 mm de largo por 10 mm de ancho. Este es un ensayo de carácter destructivo.

El equipo utilizado para las pruebas de elongación a la ruptura fue la máquina universal de ensayos Lloyd Instrument LF PLUS, tomando como guía el estándar ASTM D882-12 (Figura 6.3). En las mediciones, se puso cada probeta de 50 por 150 mm en la máquina, sujetándola a las mordazas entre sus dos extremos hasta provocar su ruptura, la respuesta del equipo se

Estudio de la biodegradabilidad y ecotoxicidad de plásticos oxodegradables

expresa en porcentaje de elongación a la ruptura, o simplemente porcentaje de elongación. Para cada ensayo se tomaron 30 probetas.



Figura 6.3 Máquina Universal, para prueba de elongación.

6.1.3.2 Caracterización química

Prueba Beilstein. Se desarrolló la prueba Beilstein, un método cualitativo y sensorial para determinar la presencia de halógenos (bromo, cloro, flúor y yodo). Para esta prueba se calentó un alambre de cobre en una llama Bunsen hasta incandescencia e inmediatamente se puso la muestra del material a la llama. Si la llama exhibe una coloración verde se toma como prueba positiva para la presencia de halógenos. Un requisito fundamental para la prueba es la limpieza de todos los materiales.

Determinación de Metales. Los posibles metales presentes en las muestras se determinaron por absorción atómica. Se analizó cobalto, hierro, manganeso y níquel. Se utilizó el equipo Modelo: Elemental solar S4 Marca: Thermo Electron Corporation. Con rango 180-900 nm y detector tipo PMT y rango de absorbancia -0.150 – 3,000 A. Rango: 180-900 nm.

Espectroscopía de infrarrojo por transformada de Fourier-Reflectancia total atenuada (FTIR-ATR). Las principales bandas de absorción que identifican los grupos funcionales presentes en los plásticos se determinaron utilizando espectroscopía infrarroja mediante la técnica de reflectancia total atenuada, FTIR/ATR. Se utilizó el equipo Nicolet iS10 FT-IR Spectrometer con cristal de diamante. El intervalo de número de onda fue de 400-4000 cm^{-1} , se empleó resolución de 2 cm^{-1} y el registro de 32 barridos. Este equipo se utilizó para la

Estudio de la biodegradabilidad y ecotoxicidad de plásticos oxodegradables

caracterización inicial y para medir el proceso de oxidación de las muestras expuestas en ambientes naturales.

6.1.4 Fotooxidación de los plásticos

La fotooxidación en laboratorio es un proceso cuyo objetivo es prever el comportamiento de los plásticos a lo largo de su vida útil; para ello se reproducen en laboratorio las condiciones naturales o artificiales a las que será sometido el material. Esto se logra a través de una cámara de intemperismo acelerado que simula efectos de radiación solar y humedad, principalmente. Para lograr dicho propósito se tomaron 360 probetas de PE oxodegradable y 360 probetas de PE convencional, las cuales se sometieron a intemperismo simulado en una cámara UV.

La degradación oxidativa abiótica se realizó utilizando una cámara de intemperismo acelerado, el equipo se encuentra en el campus de la Universidad Autónoma Metropolitana, en el laboratorio de Tecnologías Sustentables, se muestra en la figura 6.4. En la cámara las unidades experimentales fueron expuestas a la radiación ultravioleta-A en lotes de cada tipo de plástico de forma intercalada y se irradiaron durante 7 días aproximadamente, con una radiación promedio de $16,9 \text{ watts.m}^{-2}$, con temperatura media de la cámara de $57 \pm 1 \text{ }^{\circ}\text{C}$.

El material seleccionado se montó sobre un riel de exposición a la radiación de lámparas de luz blanca en la cámara de intemperismo, construida para lograr la fotooxidación. La superficie expuesta está suspendida de dicho riel en forma vertical, como se muestra en la figura 6.4b. La cámara está provista de una lámpara de arco de xenón para generar una radiación UV de 340 nm de longitud de onda que corresponde a la región del UV cercano. Se hizo un seguimiento para el material plástico oxodegradable hasta que alcanzó una elongación a la ruptura promedio de 190%, aproximadamente 160 horas; este tiempo se toma como el periodo de fotooxidación. Conocido este periodo de oxidación fotolítico, se procedió a oxidar el PEAD convencional por el mismo periodo de tiempo. El proceso de fotooxidación se mantuvo bajo condiciones controladas de humedad y temperatura.

Estudio de la biodegradabilidad y ecotoxicidad de plásticos oxodegradables



Figura 6.4 (a) Cámara de intemperismo; (b) Materiales expuestos para oxidación con radiación UV dentro de la cámara de intemperismo.

6.2 Evaluación de la degradación de plásticos en ambientes naturales

Para evaluar la degradación de las películas plásticas en ambientes acuáticos naturales se tomaron igual número de muestras de los plásticos, PEAD convencional y oxodegradable, con y sin fotooxidación, que se expusieron tanto en el mar como en el río, bajo las mismas condiciones de flotación. En los siguientes apartados se describen los pasos seguidos hasta el final de la exposición, que tuvo una duración de 180 días.

6.2.1 Preparación de las trampas de exposición

Las trampas para la exposición de los plásticos fueron construidas con tubería de PVC, de aproximadamente 19 mm de diámetro interno, con uniones y codos del mismo material, previamente lijadas y limpiadas. Para las uniones de los tubos, se utilizó cemento para PVC, que esencialmente es una suspensión de PVC en butanona. La principal virtud de este material es que no permite la separación de las uniones a menos que sea cortado, lo que garantiza que la estructura no se romperá por la acción de agentes físicos como las olas. Se construyeron estructuras cuadradas de 60 cm x 60 cm.

Estudio de la biodegradabilidad y ecotoxicidad de plásticos oxodegradables

En cada estructura se fijó una malla de fibra de vidrio, un material resistente a la corrosión, la salinidad y otros factores físicos como la humedad y la radiación. Se construyó una trampa para cada material, con dos compartimientos, con el fin que las probetas pudiesen flotar libremente dentro de la trampa con la acción de las olas. El total de trampas construidas fue de ocho, cuatro para exposición en el mar y cuatro para exposición en el río. La figura 6.5 muestra las trampas utilizadas.

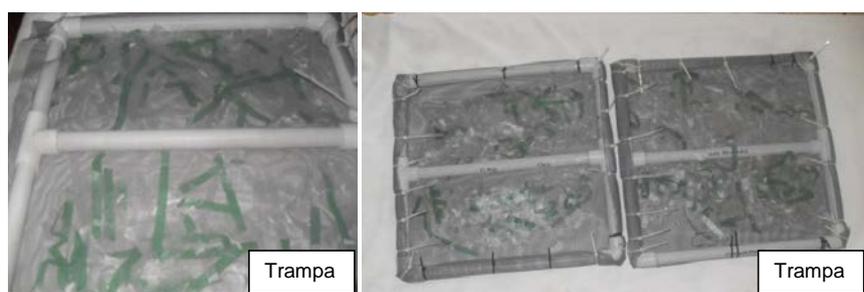


Figura 6.5 Trampas para exposición de los plásticos en ambientes naturales acuosos.

6.2.2 Diseño experimental

En este experimento se evaluaron los factores ambiente y tipo de los plásticos. El factor ambiente comprende los niveles de ambiente natural acuoso marino y acuoso de río. El tipo de plástico corresponde a cuatro niveles, PEAD convencional con y sin fotooxidación previa y PEAD oxodegradable con y sin fotooxidación previa, de acuerdo con lo que se presenta en la tabla 6.2. La variable de respuesta fue elongación a la ruptura.

En cada trampa se depositaron un total de 180 probetas de cada material (PEAD convencional, PEAD oxodegradable, PEAD convencional fotooxidado y PEAD oxodegradable fotooxidado), para un total de ocho trampas, cuatro para ambiente mar y cuatro para ambiente de río. Se realizaron 6 muestreos, con una periodicidad de 30 días cada uno y se tomaron 30 muestras de cada material para los análisis destructivos correspondientes (Tabla 6.2).

Tabla 6.2 Diseño de muestreo en ambientes naturales acuosos tropicales.

Tipo de plásticos		Número de muestreos * número de probetas	
		Mar	Río
Material de prueba	PEAD Oxodegradable	6 * 30 = 180	6 * 30 = 180
	PEAD Oxodegradable previamente fotooxidado	6 * 30 = 180	6 * 30 = 180
Control negativo	PEAD Convencional	6 * 30 = 180	6 * 30 = 180
	PEAD Convencional previamente fotooxidado	6 * 30 = 180	6 * 30 = 180

PEAD= Polietileno de alta densidad

Estudio de la biodegradabilidad y ecotoxicidad de plásticos oxodegradables

6.2.3 Ubicación geográfica de los lugares de exposición

La Figura 6.6, muestra la ubicación geográfica de los lugares seleccionados para la exposición, tanto en el mar como en el río. La zona ecuatorial es una de las dos zonas del planeta que recibe la mayor radiación solar, siendo el camino más directo de la radiación del sol hacia la tierra. La oscilación polar de la tierra tiene poca influencia en zonas ecuatoriales por tanto recibe radiación directa durante todo el año, produciendo temperaturas mucho más altas que en los polos y prácticamente constantes. El brillo solar de esta zona está entre 6 – 10 horas por día ($5,0 - 5,5 \text{ kWh m}^{-2}$), dependiendo de la época del año (soleado o lluvioso).



Figura 6.6 Mapa del lugar de exposición de las probetas de plásticos en la Costa Caribe Colombiana.

Las probetas expuestas a nivel flotante, se localizaron de la siguiente manera:

- Ambiente marino: En el muelle de la Marina de Puerto Velero (Atlántico, Colombia), localizado en latitud $10^{\circ} 55' 48''$ N y longitud $75^{\circ} 03' 32''$ O, puerto sobre el Mar Caribe.
- Ambiente de río: Sobre el Río Magdalena, en el sitio Las Flores, departamento del Atlántico, Colombia, $10^{\circ} 57' 42''$ latitud norte y $74^{\circ} 46' 54''$ de longitud occidental.

6.2.4 Exposición de muestras en agua salada

La Figura 6.7, muestra las probetas flotando libremente. Para evitar la pérdida se sujetaron con hilo plástico a los pilotes del muelle del puerto.

Estudio de la biodegradabilidad y ecotoxicidad de plásticos oxodegradables



Figura 6.7 Probetas flotantes sobre el agua marina en Puerto Velero (Atlántico, Colombia).

6.2.5 Exposición de muestras en agua dulce

Las trampas de los diferentes plásticos fueron sujetadas a la estructura que mantiene el cerramiento de las bombas de succión de agua del Acueducto Metropolitano de Barranquilla, como se muestra en la Figura 6.8.

Estudio de la biodegradabilidad y ecotoxicidad de plásticos oxodegradables



Figura 6.8 Probetas flotantes sobre el agua dulce del Río Magdalena (Barranquilla, Colombia).

6.2.6 Monitoreo de la calidad del agua

Los parámetros característicos del agua, tales como temperatura, pH, oxígeno disuelto y salinidad, se midieron desde el inicio de la exposición y en cada muestreo. Se utilizó un analizador de agua multiparámetro (marca WTW 340i), previamente calibrado en los laboratorios de la Universidad del Norte (Barranquilla, Colombia). El análisis corresponde a una muestra puntual que se logró siguiendo los protocolos de muestreo de agua superficiales Norma Técnica Colombiana NTC_ISO 5667-1.

6.2.7 Evaluación de la degradación de plásticos

Los cambios en cada material de prueba se monitorearon, siguiendo los siguientes métodos:

Inspección visual, fotográfica y microfotografía: Los cambios que mostró la superficie de las probetas plásticas, tales como la formación de rugosidad, agujeros, grietas, fragmentación, formación de biopelícula y cambios de color pueden proporcionar información sobre indicios de degradación de los materiales, la cual puede ser abiótica o biótica (Shah, *et al.*, 2008). Para todos los muestreos mensuales, estas características se inspeccionaron y se registraron mediante fotografías y fotomicrografías.

Determinación de la pérdida masa. La pérdida de masa de las muestras de ensayo es ampliamente utilizada para indicar degradación. Para evitar las interferencias ocasionadas por el depósito de materiales en la superficie de las películas, la suciedad de las probetas se removió por una breve inmersión de una solución de ácido clorhídrico al 5%, luego se lavaron con suficiente agua destilada y se secaron a temperatura ambiente en un desecador con sílice gel, por un periodo mínimo de 6 horas. Las muestras luego fueron pesadas en una balanza (JT/AR120 con precisión de 0,1 mg).

Estudio de la biodegradabilidad y ecotoxicidad de plásticos oxodegradables

Determinación de cambios estructurales mediante FTIR

Los cambios en la estructura y la formación o desaparición de grupos funcionales ocurridos durante el proceso de exposición en los ambientes naturales de río y mar, se evaluaron mediante espectroscopía FTIR. Se utilizó el rango de frecuencia entre 4000-400 cm^{-1} , con una resolución de 2 cm^{-1} , con 32 exploraciones interferogramas que se promediaron para dar los espectros. Las intensidades relativas de la absorbancia enlace carbonilo éster en 1740 cm^{-1} , enlace ceto-carbonilo en 1715 cm^{-1} , doble enlace terminal (vinilo) en 1650 cm^{-1} y doble enlace interno en 908 cm^{-1} a la de la unión de metileno a 1465 cm^{-1} se evaluaron utilizando las siguientes fórmulas (Albertsson y Karlsson, 1990):

- Índice de enlace ceto-carbonilo (KCBI) = $1715 \text{ cm}^{-1} / 1465 \text{ cm}^{-1}$;
- Índice de enlace éster-carbonilo (ECBI) = $1740 \text{ cm}^{-1} / 1465 \text{ cm}^{-1}$;
- Índice de enlaces de vinilo (VBI) = $1650 \text{ cm}^{-1} / 1465 \text{ cm}^{-1}$;
- Índice de doble enlace interno (IDBI) = $908 \text{ cm}^{-1} / 1465 \text{ cm}^{-1}$.

6.2.8 Microbiología de la biopelícula en los plásticos estudiados

De las probetas sumergidas superficialmente en el agua del Río Magdalena (agua dulce) y en la bahía de Puerto Velero (agua salada), a nivel de flotación durante un periodo de seis meses, se tomaron las probetas correspondientes al mes 6, para su estudio microbiológico.

Las muestras provenientes de agua marina se sumergieron en frascos de 10,0 mL de agua de mar previamente filtrada (0,45 μm Millipore) y esterilizada; mientras que las muestras provenientes del río (agua dulce) se sumergieron en 10,0 mL de una solución salina de cloruro de sodio 0,5% masa/volumen estéril, se agitaron muy bien hasta eliminar la biopelícula; para ayudar a remover la biopelícula de las probetas se realizó un raspado con un cepillo de cerdas plásticas estéril, esta muestra correspondió a la primera dilución. De esta solución se tomó 1 mL y se le agregó agua peptonada 0,1% estéril, hasta 10 mL. A partir de esta muestra se hicieron diluciones seriadas hasta 10^{-5} . Se homogeneizaron en un vórtex y se sembraron cada una de las muestras en profundidad y en superficie en cajas Petri, en agar marino BD 212185, con periodo de incubación de 24 horas a 37 °C y agar Sabouraud o agar papa dextrosa (PDA), con periodo de incubación de una semana y temperatura ambiente. Después del periodo de incubación el número total viable de colonias de microorganismos se contó manualmente.

Para la identificación de microorganismos presentes en las muestras se utilizaron técnicas macroscópicas y microscópicas, según Norma técnica colombiana (NTC 4092), para bacterias y para hongos como se describe a continuación:

Recuento de microorganismos viables: Aun cuando el objetivo de la caracterización microbiológica no es cuantitativo, se utilizó la Ecuación 6.1 para indicar el número de colonias por cada muestra de plástico expuesta.

Estudio de la biodegradabilidad y ecotoxicidad de plásticos oxodegradables

$$N = \frac{\sum C}{V \times 1,1 \times d} \quad (\text{Ecuación 6.1})$$

Donde:

N = Cantidad de microorganismos presentes en la muestra

$\sum C$ = Es la suma de colonias contadas en las dos cajas conservadas provenientes de dos diluciones sucesivas, por lo menos una de las cuales contiene un mínimo de 10 colonias;

V = Es el volumen de inóculo puesto en cada caja, en mililitros;

d = Es la dilución correspondiente a la primera dilución retenida o seleccionada.

1,1 = Es una constante.

Aislamiento e identificación de algunos microorganismos de la biopelícula. Se aislaron tanto los hongos como las bacterias con el fin de identificación morfológica, tinción diferenciada y pruebas bioquímicas, como se describe posteriormente. La metodología se aplicó para cada tipo de muestra (PEAD convencional, C; PEAD convencional fotooxidado, CO; PEAD Oxodegradable, O y PEAD Oxodegradable fotooxidado OO), para el agua del río y del mar, y se contrastó con un control de agua ultra destilada estéril.

Para aislar las colonias de microorganismos provenientes de las muestras de ambiente de agua salada (mar) se utilizó agar marino y caldo nutritivo para incubar las muestras de agua dulce. Se aislaron tanto los hongos como las bacterias con el fin de identificación morfológica, sólo se tomaron las colonias más grandes de cada caja Petri.

Para aislar y replicar las colonias de bacterias se utilizó agar nutritivo y agar específico para microorganismos marinos. También se usó el medio SS para reconocimiento de *Shigella* y *Salmonella*.

Bacterias:

Se hizo la caracterización macroscópica, con base en los siguientes criterios morfológicos: tamaño de las colonias (puntiforme, pequeñas, medianas, grandes); color; forma (regulares, circular, ovaladas, irregulares, filamentosas, rizoides); consistencia (seco, mucoide), opacidad (opaca, brillante), elevación de las colonias (plana, elevada, convexa, monticular); bordes (entero, ondulado, aserrado, filamentosos y rizado); superficie; olor (dulzón, fétido, amoniacal) y crecimiento (abundante, moderado, escaso).

En la identificación microscópica se utilizó el método de tinción de Gram (Madigan, 2000) y el método miniaturizado de identificación, mediante el kit BBL Crystal (Marca B. D. Diagnostic Systems Europe), el método se fundamenta en la utilización y degradación que hacen los microorganismos de sustratos convencionales cromogénicos específicos mediante distintos

Estudio de la biodegradabilidad y ecotoxicidad de plásticos oxodegradables

sistemas indicadores (MacFaddin, 2000), para bacilos Gram (-), que pertenecen a la familia *Enterobacteriaceae*, así como los más frecuentes aislamientos de bacilos Gram (-), no fermentadores de glucosa. Para cocos y bacilos se usó un kit para organismos Gram (+), se sigue como criterio de validez que la coincidencia sea superior al 90%.

Hongos: Para la identificación del género y posible especie de los hongos, en los tratamientos, se tuvieron en cuenta las características macro y microscópicas, es así, como fue preciso examinar los aislamientos de cada una de las cepas y contrastar con la literatura.

En la identificación macroscópica se utilizó el mismo procedimiento que para las bacterias y para la microscópica se desarrollaron micro cultivos. Se tomó una caja de Petri, dentro de ella se pusieron dos tubos de vidrio en forma paralela y sobre ellos se depositó un portaobjetos con un cubo de 1 cm³ de Agar; en el centro de este cubo se sembró un poco de cultivo que se tapó con un cubreobjetos. Esta operación se repitió para cada hongo. Para evitar la desecación se depositaron 5 ml de agua estéril en la caja. Se incubaron a temperatura ambiente del laboratorio, aproximadamente 25 °C, por un periodo entre 5 y 10 días y humedad relativa inferior al 60% (Casas, 1989). Para la identificación se retiró el cubreobjetos y se hizo tinción con lactofenol y observación microscópica. Se usaron como referentes, las imágenes del Departamento de Microbiología del Hospital Mount Sinai de Toronto Canadá y la página Aprendiendo en Línea del Departamento de Microbiología de la Universidad de Antioquia.

6.3 Evaluación de biodegradación en ambiente controlado en laboratorio

La parte experimental mencionada permitió evaluar la degradación de los materiales en ambiente naturales, en los cuales se pone de manifiesto la intervención de factores bióticos y abióticos de manera simultánea; por otro lado, las pruebas en condiciones controladas de laboratorio pueden realmente medir la degradación del material por la intervención de microorganismos, es decir, se puede medir la biodegradación utilizando parámetros como el consumo de oxígeno o la generación de dióxido de carbono, resultante de las reacciones bioquímicas ocurridas en los biorreactores estáticos y cerrados.

Para el desarrollo de la prueba de biodegradación de los plásticos en ambiente controlado en laboratorio, se usó como referente el método ASTM D6691-17, titulada "*Método de prueba estándar para determinar la biodegradación aeróbica de materiales plásticos en el medio marino por consorcio microbiano o por inóculo de agua de mar*". Este método de ensayo se ha desarrollado para evaluar la tasa y el grado de biodegradación aerobia de plásticos expuestos a microorganismos marinos. La biodegradación aeróbica para la presente investigación, se determinó midiendo la cantidad de biogás (dióxido de carbono) producida durante el periodo de exposición.

Estudio de la biodegradabilidad y ecotoxicidad de plásticos oxodegradables

6.3.1 Preparación de materiales

Para realizar esta prueba fue necesario obtener un inóculo, preparar las muestras de los materiales plásticos y construir un sistema respirométrico.

6.3.1.1 Obtención del inóculo

Se usó un inóculo de agua de mar natural, que se obtuvo en el puerto de Tuxpan, Veracruz (México), ubicado en 20° 57' 7.639" de latitud norte y 97° 24' 15.660" de longitud oeste. El inóculo se tomó en las primeras horas de la mañana y se caracterizó en términos de oxígeno disuelto, pH. En el laboratorio, justo antes de montar la prueba, el inóculo se oxigenó hasta saturación.

6.3.1.2 Selección del material plástico de prueba

Se pesaron 140 mg de cada clase de plásticos: PEAD, PEAD oxodegradable y su respectivo material foto oxidado. Como control positivo se utilizaron 420 mg de celulosa micro cristalina grado TLC (marca J. T. Baker), el blanco es el agua del inóculo. Todas las masas se tomaron con una precisión de $\pm 0,1$ mg. Se obtuvo un registro micro fotográfico de los materiales que se sometieron a la prueba de biodegradación.

Los plásticos se sometieron a un proceso de molienda hasta tamaño inferior a 5 mm, después se lavaron cuidadosamente con abundante agua desionizada, se esterilizaron con etanol al 50%, nuevamente se lavaron con agua estéril y se secaron en condiciones de laboratorio hasta peso constante.

6.3.2 Diseño experimental

La tabla 6.3, muestra el diseño del experimento. Los ensayos se desarrollaron por triplicado. Se usó como control positivo a la celulosa micro cristalizada y como control negativo el agua de mar, o inóculo. La variable respuesta fue la cantidad de dióxido de carbono producida, la cual se capturó en los reactores de neutralización que poseen una disolución de hidróxido de sodio de concentración aproximada 0,01 M. El experimento tuvo una duración de 60 días.

Estudio de la biodegradabilidad y ecotoxicidad de plásticos oxodegradables

Tabla 6.3 Diseño del experimento de biodegradación.

Tipo de materiales		Cantidad de muestra (mg)	Número de réplicas	Volumen de la mezcla (mL)
Material de prueba	PEAD oxodegradable	140	3	600
	PEAD oxodegradable fotooxidado previamente		3	600
Control negativo	PEAD convencional	140	3	600
	PEAD convencional fotooxidado previamente		3	600
Control positivo	Celulosa cristalizada	420	3	600
Blanco (inóculo)		-	3	600

6.3.3 Construcción del sistema respirométrico

Las pruebas respirométricas tienen como objetivo realizar mediciones directas y continuas de la producción de dióxido de carbono debidas a las diferentes reacciones biológicas presentes en los biorreactores de prueba. En esta investigación se utilizaron reactores de capacidad de 1 litro, previamente esterilizados con solución 70% de etanol y enjuagados con agua destilada estéril. Cada reactor tiene una salida lateral para la colección de biogás. Todos los componentes del sistema fueron probados para evitar la pérdida de gas por fugas. Se utilizó un baño de agua con temperatura controlada de ± 1 °C y se operó el sistema a 30 °C (Figura 6.9).

Estudio de la biodegradabilidad y ecotoxicidad de plásticos oxodegradables



Figura 6.9 Aparatos para evaluar biodegradación de PEAD convencional y oxodegradable con y sin fotooxidación, utilizando la norma ASTM D6691-17 como referente.

El respirómetro estuvo conformado fundamentalmente por un reactor biológico (Figura 6.10) inmerso en un baño de agua destilada termostatzada, unido a una serie de reactores auxiliares de captura de dióxido de carbono.



Figura 6.10 Reactor biológico para las pruebas respirométricas.

Baño de agua termostatzado a 30 ± 1 °C. El nivel del agua del baño se mantuvo a tres cuartas partes de su capacidad para asegurar que el reactor biológico permaneciera sumergido, lo que a su vez permitió mantener el nivel de la disolución de cada reactor cubierto por el agua termostatzada.

Estudio de la biodegradabilidad y ecotoxicidad de plásticos oxodegradables

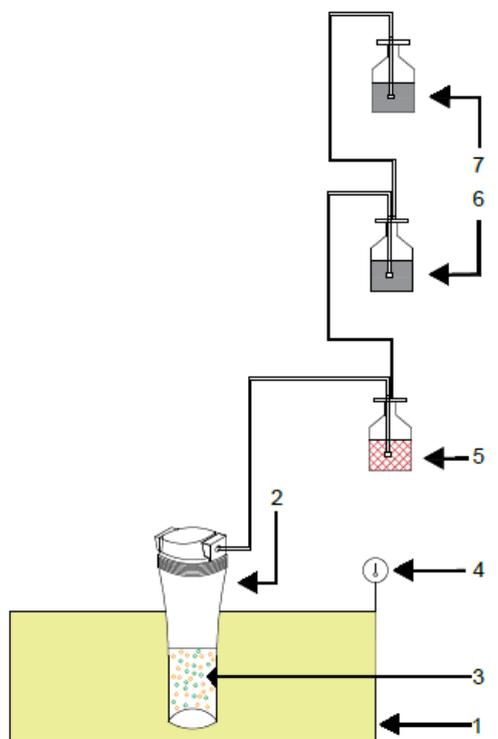
Reactor biológico. Se utilizó un recipiente transparente de un litro, al cual se le adicionaron 600 mL de agua marina natural o inóculo, nutrientes y la muestra del plástico. Permaneció sumergido en el baño de agua termostatzada y conectado a los reactores auxiliares de primera línea.

La primera línea de *reactores auxiliares* estuvo conformada por una serie de reactores plásticos oscuros de aproximadamente 250 mL de capacidad. Se conectaron herméticamente al reactor biológico a través de conectores rápidos y mangueras transparente de alta presión de 6 mm de diámetro.

Reactores deshidratantes. Una cuarta parte de la capacidad de los reactores de la primera línea se llenó con sílice deshidratante. El objetivo de poner esta trampa fue el de eliminar humedad, lo cual permitió asegurar que la concentración de la disolución de los reactores de captura de dióxido de carbono permaneciera constante. Cada reactor tiene dos orificios con conectores de salida rápida, una de ellas se unió al reactor biológico y la otra al reactor auxiliar de captura de dióxido de carbono.

Reactores de captura. Existió un doble sistema de recepción de neutralización con el objeto de evitar fugas y en consecuencia se aseguró que todo el dióxido de carbono fuera capturado. Cada reactor de la segunda línea de reactores auxiliares fue llenado con una disolución de hidróxido de sodio de concentración y volumen conocido. Cada reactor contiene dos orificios con conectores de salida rápida a los cuales se les acopla una mangueras de 6 mm, una de ellas se unió al reactor auxiliar de la primera línea y la otra al reactor auxiliar de captura. El último grupo de reactores se unió al primer reactor de captura mediante el mismo sistema de mangueras y se aseguró hermeticidad del sistema. La figura 6.11 muestra el esquema del equipo para medición de biodegradación en condiciones controladas.

Estudio de la biodegradabilidad y ecotoxicidad de plásticos oxodegradables



1. Baño de temperatura (agua destilada a T 30° C)
2. Reactor con agua marina y muestra de plástico
3. Agua marina con las muestras
4. Termómetro digital (30° C)
5. Trampa de humedad con silica gel
6. Trampas para capturar de CO₂ (NaOH 0,15M)
7. Segunda trampa para capturar de CO₂ (NaOH 0,15M)

Figura 6.11 Esquema del equipo de medición de biodegradación en condiciones controladas.

6.3.4 Evaluación de la biodegradación

Para iniciar el experimento se inoculó cada reactor con 600 mL de agua marina natural y se depositaron 0,1400 gramos del plástico correspondiente. Se adicionaron a cada reactor, nutrientes inorgánicos: cloruro de amonio en concentración equivalente (NH_4Cl) a $0,500 \text{ g.L}^{-1}$, y fosfato diácido de potasio (KH_2PO_4) $0,1 \text{ g.L}^{-1}$. Los reactores se depositaron en el baño a temperatura constante de $30 \pm 1 \text{ }^\circ\text{C}$ y sin agitación automática. La agitación se desarrolló en forma manual cada día durante todo el tiempo de exposición.

Para evaluar la producción de dióxido de carbono, después de las primeras 24 horas de haber montado el sistema, se retiraron todos los frascos de hidróxido de sodio e inmediatamente se

Estudio de la biodegradabilidad y ecotoxicidad de plásticos oxodegradables

reemplazaron por nuevos reactores con hidróxido de sodio de concentración conocida y volumen conocidos.

Los frascos retirados se valoraron con ácido clorhídrico (HCl) de concentración conocida estandarizada. La valoración permitió conocer la cantidad de dióxido de carbono producido, por diferencia con respecto al testigo. Se utilizó la ecuación 6.2 para conocer la masa de dióxido de carbono producida en cada reactor:

$$mg CO_2 = \frac{Ca(Vt-Vm)}{2} 44 \quad (\text{Ecuación 6.2})$$

Donde:

Ca = Concentración del HCl en (mmol)(mL⁻¹)

Vt = Volumen de ácido consumido para neutralizar el hidróxido de sodio del testigo (mL)

Vm = Volumen de ácido consumido para neutralizar el hidróxido de sodio de la muestra (mL)

44 = Corresponde a la masa molar del dióxido de carbono (mmol)(mg⁻¹).

Para calcular el porcentaje de mineralización de los materiales plásticos se utilizó la ecuación 6.3.

$$\% \text{ mineralización} = \frac{Cm-Ct}{Ci} 100 \quad (\text{Ecuación 6.3})$$

Donde:

Cm = Masa media de biogás producido en los reactores (mg)

Ct = Masa de biogás producido en el reactor testigo (mg)

Ci = Masa de polímero adicionado en el reactor (mg)

6.4 Evaluación de ecotoxicidad

La ecotoxicidad de los materiales objeto de estudio fue valorada utilizando la microalga eucariota *Chlorella* sp. Las cepas de *Chlorella* sp, para este trabajo fueron donadas por el Laboratorio de investigación de Biotecnología de la Universidad del Atlántico (Colombia). Se realizaron ensayos desde 72 horas hasta el ciclo completo de crecimiento de la microalga a distintas concentraciones de los materiales plásticos.

6.4.1 Acondicionamiento de las algas

El cultivo se acondicionó previamente para la prueba. Para ello, se tomaron 500 mL de un cultivo que se encontraba en la máxima etapa de crecimiento, con valor de absorbancia de 1.50 unidades y se centrifugó a 1800 rpm en una centrifugadora marca Hettich modelo EBA-20 durante 120 segundos, con el objeto de eliminar impurezas y biomasa muerta. La suspensión resultante se depositó en reactores de vidrio de 500 mL, previamente esterilizados.

Estudio de la biodegradabilidad y ecotoxicidad de plásticos oxodegradables

Se utilizó un medio de cultivo cuya fuente de nitrógeno es la urea, un fertilizante para plantas de origen comercial, generalmente usado como abono de plantas de jardín. Su contenido de nitrógeno equivalente a 200 g L^{-1} . La urea ha mostrado un buen desempeño en la curva de crecimiento de la microalga en ensayos previos, como ha sido corroborado por investigadores que sustituyeron la fuente de nitrógeno proveniente de la sal nitrato de sodio por urea cuando usaron el medio BL11 (Makavičienė *et al.*, 2011). La Tabla 6.4 enlista los componentes del medio de cultivo, expresados en g.L^{-1} . La concentración de nitrógeno total en la solución de cultivo fue 4 mmol.L^{-1} . Esta solución se esterilizó y se almacenó a una temperatura entre 3 y 5 °C en frasco oscuro.

Las suspensiones de las algas fueron preparadas con agua dulce estéril. Se agregaron a los frascos de tal manera que la concentración inicial del inóculo mostró una lectura de 0.100 unidades de absorbancia. Esto equivale a $1 \times 10^6 \text{ cél.mL}^{-1}$, de acuerdo con datos previamente obtenidos en el laboratorio, haciendo el conteo inmediatamente con una cámara Neubauer y midiendo la densidad óptica a una longitud de onda de 647 nm; longitud de onda correspondiente al barrido de máxima absorción. Esta concentración permitió asegurar que una vez iniciado el experimento la microalga aún no ha iniciado su fase de crecimiento exponencial. No se usó disolvente para las muestras, pues ellas permanecen en suspensión ayudadas por la inyección de aire de las bombas de aireación (tipo acuario).

Estudio de la biodegradabilidad y ecotoxicidad de plásticos oxodegradables

Tabla 6.4 Composición del medio de cultivo (g.L⁻¹).

Sustancia	Concentración (g.L ⁻¹)
Nitrógeno total	200
Nitrógeno amoniacal	40
Nitrógeno ureico	160
P ₂ O ₅	100
K ₂ O	100
MgO	10
S	14
B	1,5
Cu	2,5
Fe	1,0
Mn	1,0
Zn	5,0
Mb	0,03

6.4.2 Determinación de curva de crecimiento

Para la obtención patrón de crecimiento de la microalga, se tomaron 80 mL de cultivo limpio y se aseguró que la densidad óptica de la solución resultante fuera de 0,100 unidades de absorbancia. Se depositó en el reactor y se agregó el medio de cultivo con las características mostradas en la tabla 6.4. Se desarrollaron tres réplicas, que se sometieron a incubación, con periodos de 12 horas de luz y 12 horas de oscuridad. Se midió el valor de la densidad óptica cada 24 horas, por un periodo de 72 horas, de acuerdo con los lineamientos de la guía OCDE 201, con el fin de contar con una referencia y determinar la posible inhibición del crecimiento en los ensayos posteriores. En la figura 6.12 se muestran los reactores de crecimiento de la microalga o cultivos matrices.

Estudio de la biodegradabilidad y ecotoxicidad de plásticos oxodegradables



Figura 6.12 Reactores de crecimiento de la microalga *Chlorella* sp.

6.4.3 Ensayos de ecotoxicidad de los plásticos

Los plásticos de prueba fueron cortados en fragmentos inferiores a 0.5 cm², se esterilizaron con una solución comercial y se lavaron con abundante agua estéril, antes de ponerlos en los reactores.

Las pruebas de inhibición de crecimiento se realizaron añadiendo PEAD oxodegradable fotooxidado, PEAD oxodegradable sin oxidar, PEAD convencional y PEAD convencional fotooxidado en los frascos de reacción (reactores) estériles de 500 mL y la suspensión de algas con las características antes descritas. Además, se utilizó una muestra testigo, compuesta por una suspensión de microalga y nutriente en las mismas concentraciones de los demás reactores y una muestra o suspensión de la microalga sin nutrientes. Las concentraciones de plásticos fueron 473,4 mg.L⁻¹ para cada material, con tres réplicas para cada concentración; además se creó un grupo control; estos valores han sido seleccionados después de haber hecho pruebas preliminares con cantidades muy pequeñas de los plásticos en los que no se observó afectación. Se tomaron estos valores, además, guiados por valores extremos que recomienda la guía OCDE 201, que indica que se puede tomar un valor máximo de concentración de la sustancia de 100,0 mg.L⁻¹. La tabla 6.5 muestra el diseño del experimento para evaluar la ecotoxicidad.

Estudio de la biodegradabilidad y ecotoxicidad de plásticos oxodegradables

Tabla 6.5 Diseño para las pruebas de ecotoxicidad.

Tipo de materiales		Concentración de muestra (mg.L ⁻¹)	Volumen de disolución (mL)	Número de réplicas
Material de prueba	PEAD oxodegradable	478	500	3
	PEAD oxodegradable fotooxidado			
Control negativo	PEAD convencional	478	500	3
Blanco (disolución algal)		478	500	3

Los cultivos se desarrollaron en frascos de vidrio transparente de 500 mL de capacidad, a una temperatura promedio de 26 °C. Los reactores se mantuvieron tapados y se iluminaron con lámparas de neón en forma uniforme a una distancia de 10 cm de los tubos, con una intensidad luminosa promedio de 960 lúmenes. La aireación se consiguió utilizando bombas tipo acuario de dos módulos. El volumen de los reactores se mantuvo constante, en caso de disminución del volumen, se ajustó hasta el valor inicial agregando agua potable estéril. La humedad relativa del laboratorio fue de 67%. El pH de la disolución acuosa, medido en las condiciones iniciales, fue de 7,5. La figura 6.13 muestra los reactores para el análisis de Ecotoxicidad.

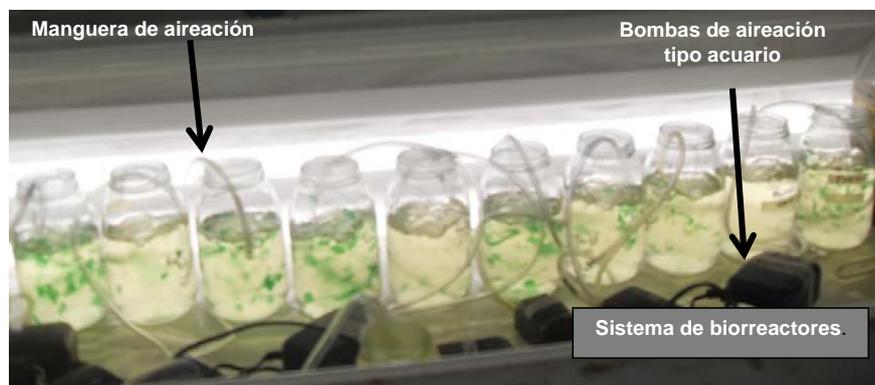


Figura 6.13 Sistema de biorreactores de prueba para evaluar ecotoxicidad de los plásticos utilizando *Chlorella* sp como organismo de prueba.

Los experimentos por lotes se monitorearon utilizando la medida de la densidad óptica durante el periodo de crecimiento de 72 horas, con lecturas cada 24 horas. Las muestras permanecieron expuestas durante 60 días, con el fin de observar cuál era el comportamiento de las algas cuando sus nutrientes se agotan. Las lecturas se realizaron mediante la extracción

Estudio de la biodegradabilidad y ecotoxicidad de plásticos oxodegradables

de 5 mL de la suspensión contenida en cada frasco. El volumen extraído en cada muestreo fue reemplazado por agua potable estéril.

Posteriormente se desarrolló una prueba de exposición para los mismos materiales a una concentración más elevada, de 1,0000 g.L⁻¹, teniendo en cuenta que los resultados de las anteriores concentraciones no fueron concluyentes. La prueba para esta concentración se corrió para el ciclo normal de crecimiento de la microalga, estimado en 16 días.

6.4.4 Técnicas analíticas para evaluar el crecimiento de la microalga

En esta etapa de la experimentación se utilizaron técnicas que permitieron evaluar el desarrollo de las poblaciones de algas.

Conteo celular

Para hacer el conteo de células se usó una cámara Neubauer de 0,1 mm de profundidad y microscopio óptico con cámara digital. La tasa de crecimiento se evaluó de acuerdo con la ecuación 6.4 (Huang *et al.*, 2009). Estas lecturas sólo se usaron como referencia para obtener la curva de crecimiento y así determinar el número inicial de cél.mL⁻¹.

$$r = \frac{\ln N_{t2} - \ln N_{t1}}{t_2 - t_1} \quad (\text{Ecuación 6.4})$$

Donde:

r = tasa de crecimiento expresada en d⁻¹.

N_{t1} = medida de la densidad en el tiempo, t₁.

N_{t2} = densidad medida a un tiempo t₂.

Determinación de la densidad óptica

Las lecturas de densidad óptica se realizaron a 647 nm, en un equipo UV/VIS marca Hach, modelo DR 5000, con paso óptico de 1 cm.

6.5 Análisis estadístico

El tratamiento estadístico de los datos se ha realizado utilizando el programa Minitab versión 16. Los datos para las diferentes pruebas fueron normalizados, mediante la prueba de Anderson-Darling (AD), observando valor-P > 0,05. El porcentaje de elongación a la ruptura, la absorbancia para comprobar ecotoxicidad y los valores de porcentaje de dióxido de carbono producido en la prueba de biodegradación en ambientes controlado, fueron normalizados mediante la prueba AD.

Estudio de la biodegradabilidad y ecotoxicidad de plásticos oxodegradables

Las pruebas de significancia estadística, en las que se desea expresar diferencias significativas entre los tratamientos se realiza mediante análisis de varianza (ANOVA), utilizando el programa Minitab 16. Para realizar comparaciones múltiples entre medias se utilizó la prueba Tukey, con este mismo programa.

Capítulo VII

Resultados

7 Resultados

En este capítulo, en primera instancia se muestran los resultados de la caracterización de los plásticos objeto de este estudio. Posteriormente se muestran los ensayos de intemperismo previo, degradación de los plásticos en ambientes reales mar y río, pruebas de biodegradación en ambientes controlados de laboratorio y por último la prueba de valoración de la ecotoxicidad utilizando la microalga *Chlorella* sp en condiciones controladas de laboratorio. Esta secuencia permitirá evaluar la degradación del PEAD oxodegradable en entornos acuáticos y verificar la hipótesis planteada.

7.1 Caracterización de materiales

Se muestran los resultados correspondientes a la caracterización de los plásticos originales PEAD convencional y oxodegradable.

7.1.1 Caracterización inicial de las películas plásticas

Espesor y calibre del material

La tabla 7.1 muestra los resultados obtenidos para el espesor promedio de 30 muestras, expresado en micras para el plástico objeto de estudio.

Tabla 7.1 Espesor de las películas de plásticos (μm).

Material	Valor promedio de espesor (μm)	Desviación estándar
PEAD oxodegradable sin estampado	18	$\pm 0,3$
PEAD oxodegradable con estampado	19	$\pm 1,0$
PEAD convencional sin estampado	18	$\pm 1,0$
PEAD convencional con estampado	19	$\pm 1,0$

De los resultados obtenidos, se infiere que el estampado no influyó en forma significativa en el espesor, convalidando el supuesto de eliminar este parámetro como variable del proceso.

Masa y densidad del material

La Tabla 7.2 muestra los valores promedio obtenidos para la masa y masa por unidad de área para 30 muestras de PEAD convencional y oxodegradable.

Estudio de la biodegradabilidad y ecotoxicidad de plásticos oxodegradables

Tabla 7.2 Valores de masa promedio en unidad de área de los plásticos de ensayo.

Material	Masa promedio de probeta (g)	Masa en unidad de área (g cm ⁻²)
PEAD convencional	0,02403 ± 0.002	1,59 x 10 ⁻³
PEAD oxodegradable	0,02407 ± 0.002	1,63 x 10 ⁻³

Se destaca que la menor desviación estándar en los valores de la masa la presentó el PEAD oxodegradable en la zona donde no hay estampado. Sin embargo, no se consideró el estampado como variable de interés en este estudio, aun cuando se sabe que es una tensión que se aplica al material y podría ocasionar variaciones de sus características.

La tabla 7.3 muestra valores de densidad promedio de los plásticos de prueba, información útil para caracterizar el material porque determinan la vida útil o de servicio del material. En este caso el PEAD convencional y el oxodegradable mantienen propiedades muy semejantes entre sí, el hecho de la presencia de aditivos de oxodegradación no marca diferencias físicas en sus propiedades.

Tabla 7.3 Valores de densidad promedio de los plásticos de ensayo.

Material	Densidad (kg.m ⁻³)
PEAD convencional	865 ± 60
PEAD oxodegradable	870 ± 50

7.1.2 Propiedades mecánicas iniciales de los plásticos

En lo relativo a porcentaje de elongación a la ruptura para el material oxodegradable, se encontró un valor de porcentaje de elongación hasta de 510.1% con desviación estándar muy alta para probetas de 50 mm de largo por 10 mm de ancho. Teniendo en cuenta que los valores de desviación estándar son muy grandes, se tomó la decisión de variar la longitud a 25 mm y el mismo ancho para disminuir la desviación y el valor de elongación así obtenido fue de 376,4 ± 41% y 353,8 ± 34% para el PEAD oxodegradable y convencional, respectivamente. La figura 7.1 muestra la distribución de probabilidad de porcentaje de elongación a la ruptura de PEAD.

Estudio de la biodegradabilidad y ecotoxicidad de plásticos oxodegradables

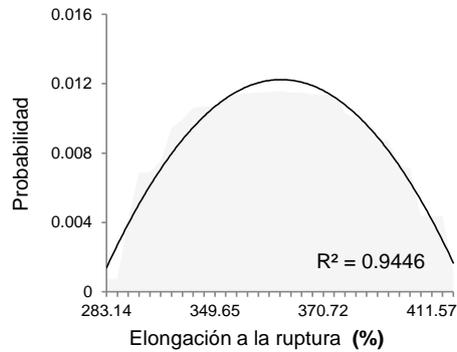


Figura 7.1 Distribución de probabilidad de los valores de porcentaje de elongación para PEAD convencional.

La elongación a la ruptura para el 31% de las muestras de PEAD convencional se encuentra en el intervalo entre 334,6% y 360,3% de elongación a la ruptura, mientras el 59% de los datos se encuentran concentrados entre 334,6% y 386,0%.

La figura 7.2, muestra la distribución de probabilidad de los datos tomados para analizar las propiedades mecánicas en término del porcentaje de elongación a la ruptura para la muestra del plástico PEAD oxodegradable.

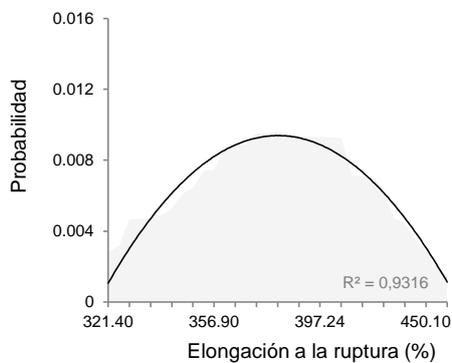


Figura 7.2 Distribución de probabilidad de los valores de porcentaje de elongación para PEAD oxodegradable.

En términos generales se observa que los datos muestran comportamiento semejante para los dos tipos de plásticos. Este es el resultado esperado, dado que el agregado de aditivo prooxidante no debe alterar las propiedades del polímero. El número de frecuencias de los datos es semejante; se observa una leve diferencia hacia mayor dispersión de los datos en el PEAD oxodegradable con límite superior mayor.

Estudio de la biodegradabilidad y ecotoxicidad de plásticos oxodegradables

Las figuras 7.1 y 7.2, muestran el comportamiento de las probetas en función del porcentaje de elongación. Se observó que esta propiedad sigue una distribución normal. En realidad el comportamiento de los plásticos se debe a su estructura interna (su estructura química), al peso molecular y a su distribución de pesos moleculares, y a la forma como dichas moléculas se acomodan unas con respecto a otras, en este caso el PEAD es un polímero de estructura lineal muy poco ramificada y el hecho de la adición de sustancias que provocan la oxodegradación no alterará la estructura química porque estos aditivos no están enlazados químicamente a la cadena (Ammala *et al.*, 2011); por tanto, no se esperaría una diferencia marcada en el comportamiento de las propiedades mecánicas que son consecuencia de las masas moleculares.

Se puede observar que los materiales tienen comportamiento semejante, las probetas se pueden romper con porcentajes de elongación desde 283.1% hasta 466.6% de elongación, y los valores corresponden a una distribución normal. Con el fin de disminuir la dispersión se tomó la decisión de tomar las probetas de la parte frontal y su correspondiente posterior de cada bolsa para las pruebas subsiguientes.

7.1.3 Caracterización química

Las pruebas a la flama producen olores característicos para cada polímero, los dos plásticos se consumieron con una flama azul transparente y se produjeron gotas cuando fundió. En la prueba Beilstein se produjo la típica coloración azul transparente, indicando que no hay halógenos para los dos tipos de plásticos.

El plástico PEAD oxodegradable mostró un contenido de manganeso de 1,0%. El hierro se encontró en cantidades en el límite de detección y los demás metales no fueron detectados.

El análisis inicial FTIR, de PEAD oxodegradable y convencional mostró cuatro bandas de absorción. La tabla 7.4, muestra las frecuencias e intensidades de los materiales estudiados, se puede observar que ambos materiales presentaron las mismas bandas; excepto para el material oxodegradable foto oxidado artificialmente en la cámara de intemperismo, que exhibe una banda muy débil en 1715 cm^{-1} , lo que permite inferir la oxidación a nivel superficial de la película de PEAD oxodegradable. La banda de absorción ha sido reportada por diferentes investigadores (Muthukumar, 2014; de la Orden, 2015), como una absorción debida a la presencia del grupo carbonilo, lo que se traduce como un proceso de oxidación, en ese caso fotoquímico, y por tanto, abiótico. Esta es una condición deseable provocada con el objeto de comparar los procesos de oxidación en condiciones de ambiente natural con la fotooxidación previa en condiciones de laboratorio. El siguiente apartado muestra los resultados de la foto oxidación de los materiales de ensayo.

Estudio de la biodegradabilidad y ecotoxicidad de plásticos oxodegradables

Tabla 7.4 Frecuencia e intensidad relativas de absorción FTIR de los plásticos objeto de estudio (fuerte: f; media: m; débil: d).

Materiales PEAD	Intensidad de las frecuencias de absorción (cm ⁻¹)				
	2916	2849	1715	1475	730
Convencional (C)	<i>f</i>	<i>f</i>	-	<i>m</i>	<i>m</i>
Convencional oxidado (CO)	<i>f</i>	<i>f</i>	-	<i>m</i>	<i>m</i>
Oxodegradable (O)	<i>f</i>	<i>f</i>	-	<i>m</i>	<i>m</i>
Oxodegradable oxidado (OO)	<i>f</i>	<i>f</i>	<i>d</i>	<i>m</i>	<i>m</i>

7.2 Fotooxidación de los plásticos

La fotooxidación de PEAD oxodegradable y PEAD convencional en condiciones controladas, permite determinar el efecto de la degradación abiótica previa en los procesos posteriores de degradación en los ambientes acuosos naturales de mar y río, y en las pruebas de ecotoxicidad y biodegradación controlada en laboratorio. Se desarrollaron varios ensayos con diferentes tiempos de exposición. Para tiempo de 160 horas de foto oxidación en la cámara UV, las probetas de PEAD oxodegradable se oxidaron hasta pérdida total de sus propiedades mecánicas. La superficie de algunas probetas se tornó agrietada y en algunos casos se produjo una completa fragmentación al tacto, el plástico oxodegradable se rompió, en la mayoría de los casos, hasta piezas muy pequeñas llamadas microplásticos (nombre dado por la Administración Oceánica y Atmosférica, NOAA), por su tamaño que es inferior a 5 mm. Sin embargo, este fenómeno no se presentó en las probetas de PEAD convencional fotooxidado.

Considerando la diferencia de comportamiento de los materiales frente a la fotooxidación controlada en laboratorio se estableció que el periodo de fotooxidación apropiado fuese de 96 horas, periodo que garantiza que el PEAD oxodegradable fotooxidado, reduzca su porcentaje de elongación a $190 \pm 20\%$, de tal forma que las probetas conservaran su integridad para las pruebas de exposición en ambientes naturales. El PEAD convencional se foto oxidó en un periodo de tiempo equivalente y bajo las mismas condiciones de humedad.

La figura 7.3, muestra el porcentaje de elongación de las probetas de PEAD oxodegradable y convencional en función del tiempo de fotooxidación en la cámara de intemperismo. Las muestras, así envejecidas, luego se expusieron en condiciones naturales junto con probetas sin tratamiento.

Estudio de la biodegradabilidad y ecotoxicidad de plásticos oxodegradables

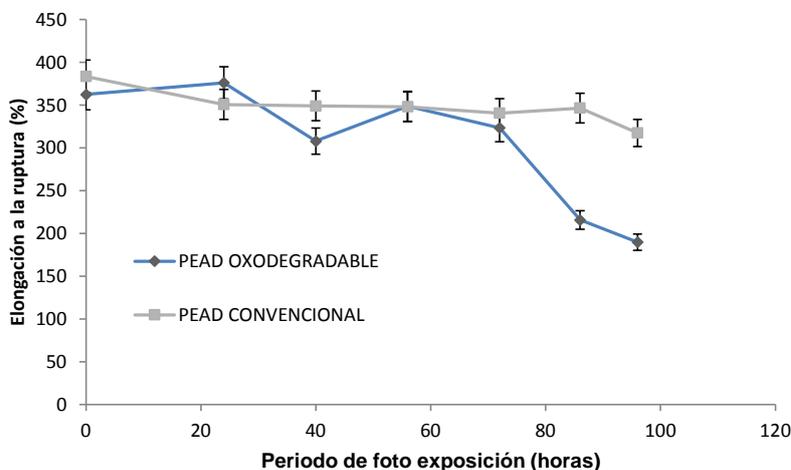


Figura 7.3 Variación de la elongación a la ruptura en función del tiempo de fotooxidación para PEAD convencional y oxodegradable.

Se observó que el PEAD convencional es estable a la fotooxidación (envejecimiento acelerado) si se compara con el PEAD oxodegradable. Además se encontró que el porcentaje de elongación presenta una alta dispersión entre las réplicas, con desviaciones estándar de más o menos 20 %; variabilidad aceptada teniendo en cuenta que el uso de estos plásticos es corto y no requiere especificaciones rigurosas para su fabricación.

Otra posible causa de dispersión se debe a variaciones propias del proceso de envejecimiento en la cámara de oxidación, puede presentarse diferencia en el grado de exposición, influenciada por la vida media de cada lámpara y por la posición de la probeta dentro de la cámara. Este último factor se compensa por el movimiento de rotación del riel que soporta las probetas dentro de la cámara. Para fines de este estudio se admitió que el comportamiento de las probetas fue homogéneo.

Análisis estadístico de porcentaje de elongación a la ruptura para los materiales originales

Los plásticos de partida presentan estadísticamente diferencias significativas. Se analizaron los valores de elongación a la ruptura para los cuatro tipos de plásticos (PEAD convencional y oxodegradable con y sin foto oxidación). Después de normalizar los datos se encontró que el valor de F es 95,79 y el valor de P es 0,000; como P es menor que 0,05, se encontró que los plásticos de partida son significativamente diferentes en término de sus propiedades mecánicas. De la prueba de Tukey se encontró que hay diferencia significativa, para nivel de confianza de 95 %, entre el PEAD oxodegradable foto oxidado y los demás materiales; así mismo se encontró que PEAD foto oxidado fue significativamente diferente a PEAD

Estudio de la biodegradabilidad y ecotoxicidad de plásticos oxodegradables

oxodegradable y a PEAD convencional; por su parte PEAD oxodegradable y PEAD convencional no se encontraron diferencias entre sí. En el anexo 1 se encuentran los valores para los residuos, en la que se muestra que no se violan los supuestos de validez de la prueba. En los apartados subsiguientes se mostrará si estas diferencias se mantienen y se determinará si el medio influye en la degradación.

7.3 Degradación de los plásticos ambientes naturales

Las probetas expuestas en los dos ambientes acuáticos se recuperaron hasta los 180 días, con mayor o menor grado de deterioro. Los siguientes apartados muestran los resultados de degradación de las probetas en condiciones naturales, registrados en los seis muestreos programados.

7.3.1 Ambiente marino

7.3.1.1 Características del agua marina

Durante el periodo de muestreo se registraron los valores de temperatura, conductividad, pH y oxígeno disuelto del agua del mar del lugar de exposición de las muestras (Tabla 7.5).

Tabla 7.5 Valores promedio para los parámetros de calidad del agua marina durante los meses de exposición.

Parámetro	Valor
Temperatura (°C)	27,6 ± 0,5
pH	8,21 ± 0,01
Oxígeno disuelto (mg.L ⁻¹)	7,07 ± 0,27
Conductividad (mS cm ⁻¹)	55,0 ± 0,25

El análisis de la tabla 7.5 corresponde a una muestra puntual, siguiendo los protocolos de muestreo de agua superficiales Norma Técnica Colombiana NTC_ISO 5667-1. Los parámetros aquí registrados están dentro de los valores criterio para la preservación de la flora y la fauna. El valor de referencia para el oxígeno disuelto fue de 4 mg.L⁻¹; el valor de pH se mantuvo dentro del intervalo apropiado, sin embargo este valor puede llegar a ser superior a 8,7 y aun preservar condiciones apropiadas para la preservación de la vida; la salinidad está dentro de valores característicos para agua marina con bajo aporte de agua dulce y baja evaporación.

Otros parámetros importantes que permitieron determinar la calidad de las aguas marinas y costeras se encuentran en la tabla 7.6. Los sólidos suspendidos totales se encontraron sobre el límite; de acuerdo a la época del año se pueden encontrar diferencias en su concentración. Los

Estudio de la biodegradabilidad y ecotoxicidad de plásticos oxodegradables

altos valores están asociados a los vertimientos que hacen los lugareños a los cuerpos de agua. En lo relativo a los nutrientes inorgánicos tales como: nitrito (N-NO₂⁻), nitrato (N-NO₃⁻), amonio (N-NH₄⁺) y fosfatos (P-PO₄⁻³), como indicadores de la calidad de las aguas, se presentaron valores que corresponden a agua de buena calidad para el desarrollo de la flora y la fauna.

Tabla 7.6 Caracterización del agua marina en Puerto –Velero (Atlántico, Col.).

Parámetro	Unidad	Valor	Norma
Sulfatos (SO ₄)	mg SO ₄ L ⁻¹	5684	ASTM 4500C
Hierro (Fe)	mg Fe L ⁻¹	0,03	ASTM 3500B
Nitratos	mg NO ₃ L ⁻¹	0,7	ASTM 4500NO ₃ B
Nitritos	mg NO ₂ L ⁻¹	0,037	ASTM 4500NO ₂ B
Salinidad*	UPS	35,4	ASTM 2510B
Alcalinidad	mg CaCO ₃ L ⁻¹	3160	ASTM 2320B
Dureza Total	mg CaCO ₃ L ⁻¹	2460	ASTM 2340B
Dureza cálcica	mg CaCO ₃ L ⁻¹	1120	ASTM 2340B
Dureza magnésica	mg CaCO ₃ L ⁻¹	1340	ASTM 1340B
Cloruros	mg Cl L ⁻¹	14180	ASTM 14180B
Sólidos totales	mg.L ⁻¹	64995	ASTM 2540B
Sólidos suspendidos totales	mg.L ⁻¹	104	ASTM 2540B
pH*	Unidades de pH	8.22	ASTM 4500 HTB
Temperatura*	°C	28	ASTM 2550B
Conductividad*	mS/cm	55	ASTM 2510B
Color aparente*	UPtCo	3,01	ASTM 2120B
Turbiedad*	NTU	4,99	ASTM 2130B

De los resultados se infiere que la calidad del agua fue adecuada para la vida marina, sin embargo se debe anotar que existe un gran riesgo por los vertimientos de aguas residuales de asentamientos humados dedicados a la atención al turismo y por los residuos que producen las embarcaciones que frecuentemente atracan en este puerto.

7.3.1.2 Evaluación de la degradación

Se mostrarán las fotografías y micro fotografías de los materiales plásticos con y sin exposición en el tiempo como evidencia de la degradación.

Inspección visual de las probetas

Estudio de la biodegradabilidad y ecotoxicidad de plásticos oxodegradables

La inspección visual es uno de los parámetros acostumbrados para la caracterización de los materiales como evidencia de degradación. La figura 7.4 muestra los materiales originales, sin tratamiento. Esencialmente poseen apariencia semejante, brillo y transparencia. Los materiales presentan una pigmentación verde que no fue tenida en cuenta como variable de observación.

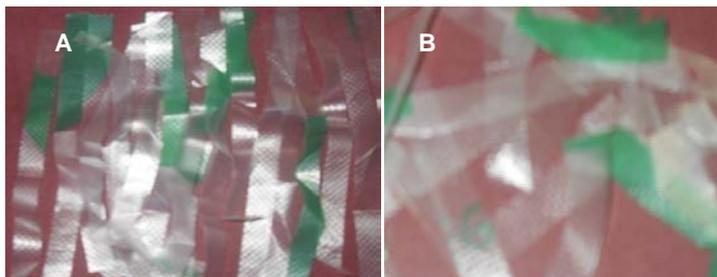


Figura 7.4 Registro fotográfico de plásticos sin tratamiento: (A) PEAD convencional, (B) PEAD oxodegradable.

Las figuras 7.5 a 7.8 muestran el aumento de biopelícula formada en los materiales y se compara con el plástico sin exposición. Se presentan las imágenes del material expuesto a treinta días y 180 días. La intención de la imagen fue evidenciar el aumento de biopelícula sobre las probetas.

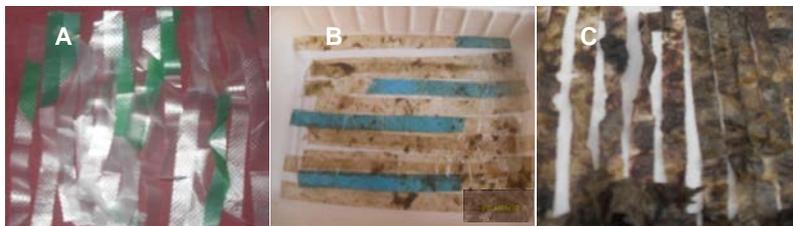


Figura 7.5 Registro fotográfico de PEAD convencional expuesto en ambiente marino, (A) sin exposición, (B) 30 días, (C) 180 días.

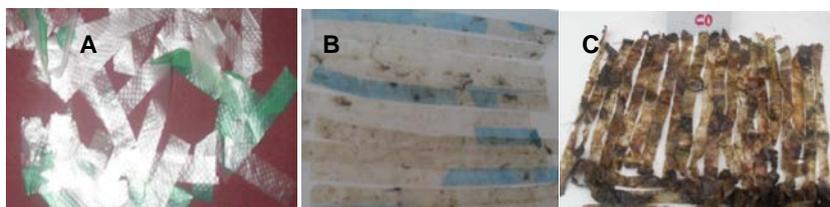


Figura 7.6 Registro fotográfico de PEAD convencional fotooxidado: (A) sin exposición; expuesto en ambiente marino: (B) 30 días, (C) 180 días.

Estudio de la biodegradabilidad y ecotoxicidad de plásticos oxodegradables

Las fotografías muestran que efectivamente sobre los plásticos se depositó una gran cantidad de materiales ambientales, limo y suciedad, llamado biopelícula (en inglés: biofouling), lo cual significa cierta afinidad de micro y macroorganismos por los plásticos expuestos, presumiblemente debida a su hidrofobicidad. Este depósito se encontró en todas las probetas, en algunas de ellas está muy fuertemente adherido. Como se observa la cantidad de biopelícula aumentó con el tiempo y para cuantificar la masa de biopelícula depositada se pesaron 30 muestras de cada material y se encontró que en promedio la ganancia de peso es alrededor de 50 veces el peso inicial de cada probeta y esto fue una constante para todos los materiales. El registro fotográfico muestra semejanza entre PEAD convencional y PEAD convencional fotooxidado.

En la medida que aumentó el tiempo de exposición, la biopelícula fue difícil de remover con el simple cepillado en todas las películas. Esta unión de los microorganismos al plástico, para formar una biopelícula es el primer paso hacia la degradación, generalmente se conoce con el nombre de biodeterioro. El biodeterioro fue más notable en las muestras de PEAD oxodegradable fotooxidado, quizás debido al efecto de la irradiación previa. La figura 7.7, muestra el PEAD oxodegradable sin exposición, expuesto 30 y 180 días en ambiente marino, respectivamente.



Figura 7.7 Registro fotográfico de PEAD oxodegradable: (A) sin exposición; expuesto en ambiente marino: (B) 30 días, (C) 180 días.

Si se comparan las fotografías de las figuras 7.5, 7.6 y 7.7, no se observan diferencias entre las probetas del plástico PEAD oxodegradable con respecto al PEAD convencional y al PEAD convencional fotooxidado. En todos los casos se encontró que las probetas fueron colonizadas por microorganismos (algas, bacterias, mohos, entre otros) y macroorganismos, tales como: peces, crustáceos y anélidos (algunos de estos organismos nacieron dentro de las trampas).

La figura 7.8 muestra el material PEAD oxodegradable fotooxidado. Su comportamiento fue diferente a los demás plásticos estudiados. Se fracturó fácilmente después del primer mes de exposición, lo que permite inferir pérdida completa de las propiedades mecánicas. La mayoría de residuos de las probetas de este material se retiraron del lugar de exposición a los 150 días debido al fraccionamiento y así evitar la pérdida completa; se continuaron observando sólo algunas que conservaron su integridad.

Estudio de la biodegradabilidad y ecotoxicidad de plásticos oxodegradables

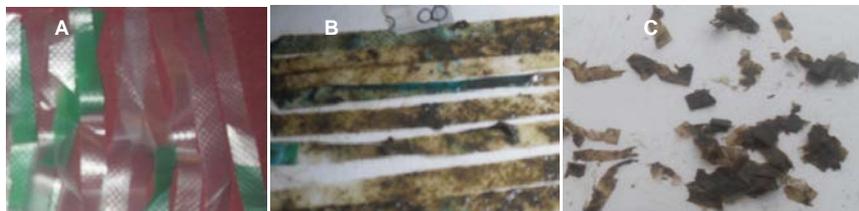


Figura 7.8 Registro fotográfico de PEAD oxodegradable fotooxidado: (A) sin exposición; expuesto en ambiente marino, (B) 30 días, (C) 150 días.

Una ampliación de los cambios visuales que se produjeron en la superficie de los plásticos se registró mediante foto microfografías. Se muestran en este apartado imágenes del plástico original, y plásticos con la menor y la mayor afectación. Mayores detalles de los cambios encontrados para cada muestreo se pueden encontrar en el Apéndice 9.

Además de grietas y agujeros, una de las evidencias más frecuentemente encontradas como signo de envejecimiento fotoquímico natural fue el amarillamiento de la superficie del material, situación generalizada en las probetas expuestas desde el primer hasta los 180 días. Esto se observó una vez que todas las probetas se limpiaron. La figura 7.9 muestra la microfotografía del plástico original (sin tratamiento).

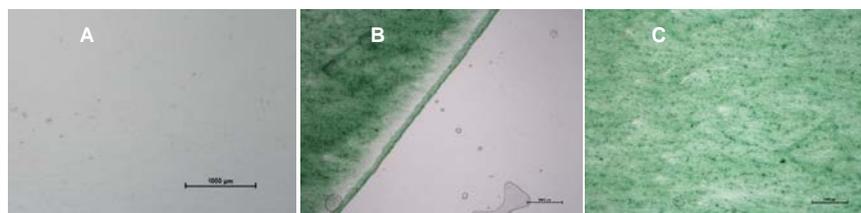


Figura 7.9 Fotomicrografía de los plásticos originales: (A) PEAD convencional sin pigmento, (B) PEAD oxodegradable con y sin pigmento, (C) PEAD convencional pigmentado.

Las figuras 7.10 a 7.13, muestran una secuencia de micrografías de las probetas tomadas una vez que finalizó la exposición, para los materiales PEAD convencional, PEAD convencional fotooxidado, PEAD oxodegradable y PEAD oxodegradable fotooxidado, respectivamente. En ellas se comparan los cambios que ocurrieron después de remover la biopelícula formada. La primera de las tres corresponde al material original, y las dos imágenes siguientes muestran el contraste con la menor y la mayor afectación observada después de permanecer 180 días expuestas en el mar.

Estudio de la biodegradabilidad y ecotoxicidad de plásticos oxodegradables

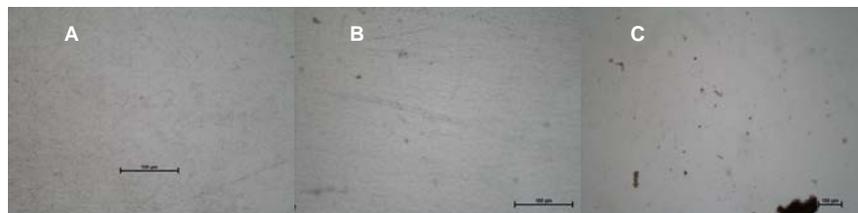


Figura 7.10 Fotomicrografía de PEAD convencional: (A) sin exposición; expuesto 180 días en el mar: (B) sin afectación observable; (C) con afectación observable.

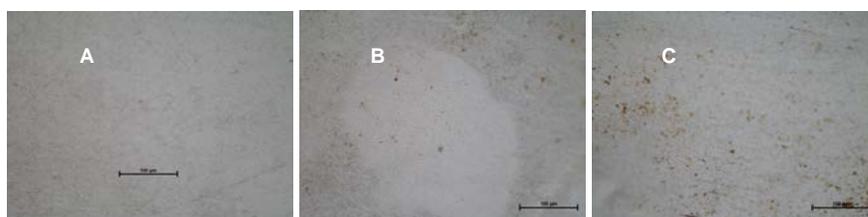


Figura 7.11 Fotomicrografía de PEAD convencional fotooxidado: (A) sin exposición; expuesto 180 días en el mar: (B) sin afectación observable; (C) con afectación observable.

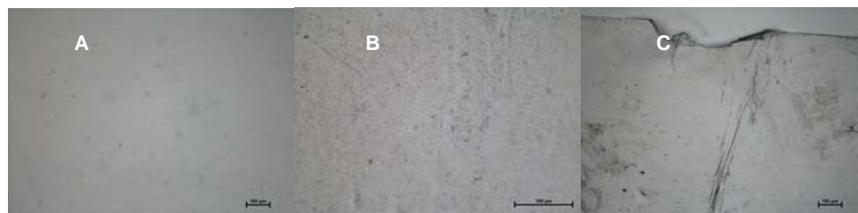


Figura 7.12 Fotomicrografía de PEAD oxodegradable: (A) sin exposición; expuesto 180 días en el mar: (B) sin afectación observable; (C) con afectación observable.

Tanto en el PEAD convencional como el fotooxidado no se evidenciaron cambios aparentes, sólo se observó cambio en su transparencia; hubo pérdida del brillo y de luminosidad. Algunas microfotografías muestran que los bordes de las probetas se erosionaron levemente. Las micrografías mostraron biopelícula adherida al material que no se removió con el cepillado y la aplicación de sustancias detergentes, ni con el lavado con disolución ácida. Estos registros permiten inferir que los materiales fueron estables físicamente, conservaron su integridad; no se observaron grietas, orificios o rugosidad que permitan inferir degradación, excepto lo mostrado por el PEAD oxodegradable fotooxidado (Figura 7.13), que se fragmentó desde el inicio de su exposición, el deterioro aumentó con el aumento del tiempo de exposición, se inició con grietas y terminó fragmentando completamente.

Estudio de la biodegradabilidad y ecotoxicidad de plásticos oxodegradables

Las microfotografías de la figura 7.13 muestran el comportamiento de las probetas de PEAD oxodegradable fotooxidado durante el mismo periodo de observación en ambiente marino. Se retiraron la mayor parte de los residuos de las probetas a los 150 días de exposición, teniendo en cuenta el grado de deterioro presentado y para evitar la pérdida de evidencia de degradación de este material. Sin embargo, se conservaron en el lugar de exposición las piezas o probetas que presentaron el menor deterioro y por tanto el mayor tamaño.

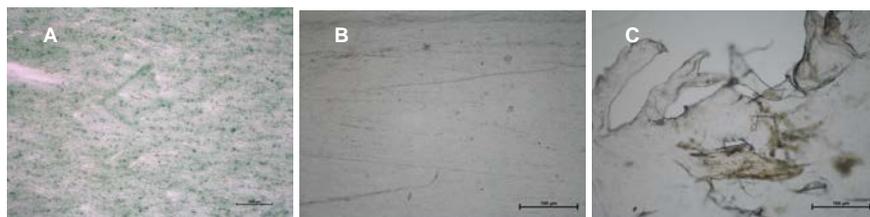


Figura 7.13 Fotomicrografía de PEAD oxodegradable fotooxidado: (A) sin exposición; expuesto 180 días en el mar; (B) sin afectación observable; (C) con afectación observable.

Son notorios los cambios encontrados en este material. La micrografía 7.13b, muestra las grietas que son la señal inicial de deterioro, y la figura 7.13c, muestra una película con evidencias claras de degradación. Este patrón de destrucción del material se va intensificando en la medida que avanza el periodo de inmersión de las probetas en el mar. La fragmentación, la presencia de agujeros, y rugosidades dan señal de la degradación. Parece concomitante la degradación abiótica previa y la presencia de aditivo prodegradante.

Si se comparan el PEAD oxodegradable con PEAD convencional previamente fotooxidados se infiere que el agente prodegradante ejerce una influencia determinante en el deterioro del PEAD oxodegradable. Ahora bien, se espera que ocurra lo mismo con el PEAD oxodegradable, sin embargo la desintegración no ocurrió, en consecuencia la degradación abiótica fue el factor diferenciador. Al comparar PEAD convencional con PEAD oxodegradable, se observaron comportamientos semejantes; la presencia de aditivo no aceleró el proceso de deterioro del plástico bajo las condiciones de prueba establecidas, para este nivel de observación.

Pérdida de masa

A pesar de la exhaustiva limpieza no fue posible determinar el porcentaje de pérdida de peso para las muestras, debido a la dificultad para remover completamente la biopelícula formada sin causar deterioro en el material. Este parámetro no fue muy útil en el caso de estas películas plásticas expuestas en el mar, se atribuye a que su grosor es muy bajo y no es apreciable la valoración de la pérdida de masa, sumado a la dificultad de remover los depósitos de biopelícula.

Propiedades mecánicas: elongación a la ruptura

Estudio de la biodegradabilidad y ecotoxicidad de plásticos oxodegradables

La figura 7.14 muestra las líneas de tendencia de las propiedades mecánicas de las probetas durante los seis meses de muestreo para los plásticos estudiados.

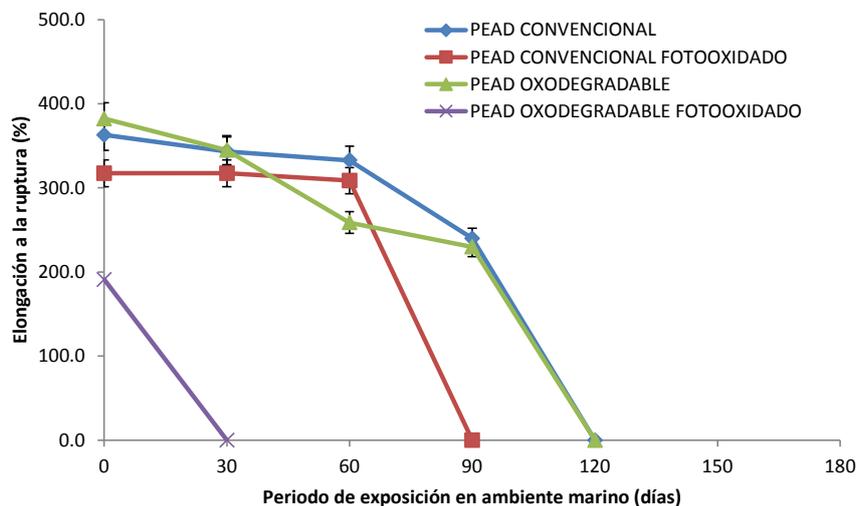


Figura 7.14 Líneas de tendencia de las mediciones de porcentaje de elongación para las muestras expuestas en ambiente de agua marina durante 180 días.

Se observó una disminución del porcentaje de elongación marcadamente diferente entre PEAD oxodegradable fotooxidado y los demás materiales. Se evidenció, por tanto, que el proceso de fotooxidación previo junto con la presencia de agente prodegradante incide directamente en la pérdida de la elongación a la ruptura; y por tanto, en las propiedades fisicoquímicas del material.

Bajo estas circunstancias, PEAD convencional exhibió comportamiento similar a PEAD oxodegradable; por consiguiente, se puede inferir que la presencia de aditivos pro oxidantes no determinó diferencias en el comportamiento de los materiales expuestos en condiciones de agua marina natural. Las propiedades mecánicas de todos los materiales se perdieron completamente entre los muestreos a 90 y 120 días de exposición. Se puede asumir que además de factores abióticos, el deterioro del material es consecuencia de la intervención de los macro organismos marinos, tales como los ostiones que formaron una gran película sobre cada probeta (ver micrografía Figura 7.15a). Aún después del proceso de limpieza, una gran cantidad de biopelícula permaneció adherida a las probetas (ver micrografías de la Figura 7.15b), significando que se produce biodeterioro y consecuentemente pérdida de las propiedades mecánicas de las probetas, como lo evidencian los resultados mostrados en la Figura 7.14. Todos los plásticos, sin excepción, acumularon suciedad. Este fenómeno se cataloga como abiótico-biótico ya que la suciedad adherida a la película de PEAD es solo a

Estudio de la biodegradabilidad y ecotoxicidad de plásticos oxodegradables

nivel superficial y no hay evidencia de bioasimilación como nutriente para los microorganismos, sin embargo la biopelícula cambia la superficie y las propiedades del material.



Figura 7.15 Fotografía y fotomicrografía de la biopelícula sobre plásticos expuestos 180 días en ambiente marino (A) PEAD convencional, (B) PEAD oxodegradable.

Análisis estadístico del porcentaje de elongación a la ruptura para los materiales expuestos en ambiente marino

Teniendo en cuenta que los materiales originales presentan diferencias significativas como se reseñó en el apartado 7.2, se procedió a determinar la influencia del medio sobre cada material después de haber estado expuesto durante 180 días.

Se aplicó la prueba AD a los datos para exposición a 180 días y se encuentra que se comportan de manera normal (Anexo A2-1 a A2-3). El análisis de varianza para el conjunto de los datos normalizados muestra un valor F igual 1,57 y un valor P igual a 0,271, lo cual indica que la degradación de los plásticos, es decir, todos los materiales expuestos sin importar su clase o tratamiento previo, se comportaron de manera semejante. Para saber si el comportamiento fue el mismo durante todo el periodo de observación se desarrolló análisis estadístico para cada mes. La tabla 7.7 muestra el análisis ANOVA, obtenido para los materiales mes a mes en el medio marino. Se observó que después de 90 días de exposición los materiales no registran valores de elongación a la ruptura; la máquina de prueba no es suficientemente sensible. Además, se observó que el plástico PEAD oxodegradable fotooxidado sólo registró elongación a la ruptura en el material inicial, de los posteriores muestreo fue imposible el registro de este parámetro.

Estudio de la biodegradabilidad y ecotoxicidad de plásticos oxodegradables

Tabla 7.7 Análisis de varianza para porcentaje de elongación de los materiales expuestos en el mar durante 180 días.

Tiempo de exposición (días)	Grados de libertad	Valor F	Valor P
30	2	2,36	0,102
60	2	7,45	0,001
90	1	0,21	0,667
120 a 180	No hay datos	No hay datos	No hay datos

El segundo mes mostró un valor de $P < 0,05$, significa que para este mes los diferentes plásticos no se comportaron de la misma forma en el ambiente marino. Por tanto se procede a realizar comparaciones para saber cuáles son los materiales que registran diferencias significativas.

Prueba de comparaciones múltiples para medio marino

La prueba de Tukey (Anexo A3-1), muestra que existen diferencias estadísticamente significativas entre los materiales expuestos en ambiente marino en el mes dos. Con intervalo de 95% de confianza se encontró que PEAD oxodegradable fue significativamente diferente a PEAD convencional y PEAD convencional fotooxidado. No se muestran evidencias de diferencias estadísticamente significativas a un nivel de confianza de 95% entre PEAD convencional y PEAD convencional fotooxidado. El Anexo A3-2, muestra los supuestos de validez para los residuos a las pruebas estadísticas practicadas a los datos de materiales tratados en ambiente marino, los cuales no muestran indicio de violación de criterios de normalidad, homocedasticidad y aleatoriedad.

Determinación de cambios estructurales mediante espectroscopía FTIR

Como evidencia de los cambios químicos, debidos a la intemperización en condiciones de exposición en ambiente marino, se registraron las frecuencias de absorción correspondientes a las tensiones alifática-CH en la región entre 2850-2950 cm^{-1} , flexión $-\text{CH}_2-$ en 1472 y 1463 y la aparición de una absorción débil carbonílica, hacia 1712 cm^{-1} , absorción que se presentó en el material después de fotooxidación de los plásticos en la cámara de intemperismo. El espectro FTIR del PEAD muestra cuatro bandas características que permanecen incluso después del periodo de intemperización natural en el mar (Tabla 7.8). Los espectros correspondientes al PEAD oxodegradable fotooxidado sin intemperización natural en el mar, exhiben una absorción muy débil hacia 1712 cm^{-1} , que se atribuye a la incorporación de oxígeno en el proceso de

Estudio de la biodegradabilidad y ecotoxicidad de plásticos oxodegradables

fotooxidación en la cámara de intemperismo. El cambio más sobresaliente con respecto a la intemperización natural en el mar se observó en el PEAD oxodegradable sin fotooxidación previa, cuyos espectros muestran absorciones muy débiles hacia 1715 cm^{-1} .

Los espectros de la figura 7.16, corresponden a los plásticos sin exposición, PEAD convencional y PEAD oxodegradable fotooxidado. Se pudieron registrar cambios en la región de absorción del carbonilo, hacia 1715 cm^{-1} . A manera de ejemplo se muestra el espectro para PEAD oxodegradable fotooxidado, después de 60 días de exposición en el mar. Las diferencias encontradas para todas las probetas se expresaron de manera más simple a través del IC.

Tabla 7.8 Principales bandas de absorción FTIR del PEAD oxodegradable expuesto 180 días en mar.

Tipo de Absorción	Absorción Inicial (cm^{-1})	Absorción final (cm^{-1})
deformación –C-H (metilo)	2928 (2880-2975)	2930 (2880-2975)
Deformación–C-H (metilo asimétrico)	1472 (m) δ C-H asimétrico	1472 (δ C-H asimétrico)
Deformación asimétrica de –CH ₂	2855	2855
Tensión –OH	Ausente	Presente hasta 60 días
Tensión C-O	Ausente	1070
Tensión C=C (olefinas), conjugado con –C=O	Ausente	1600
Tensión C-H (olefinas)	Ausente	3010-3095
Tensión C=O	Ausente	1750 (débil)

La banda de absorción registrada en 3400 cm^{-1} , asignada a vibración de tensión –OH, se presentó sólo en el segundo mes de exposición, lo que implica que es difícil para los grupos hidróxido mantenerse en el proceso de fotoenvejecimiento natural. La absorción a 1715 cm^{-1} es muy débil, corresponde al grupo carbonilo, cetonas y ésteres. La fuerte absorción a 1640 cm^{-1} , corresponde a deformaciones del grupo –CH₂.

Estudio de la biodegradabilidad y ecotoxicidad de plásticos oxodegradables

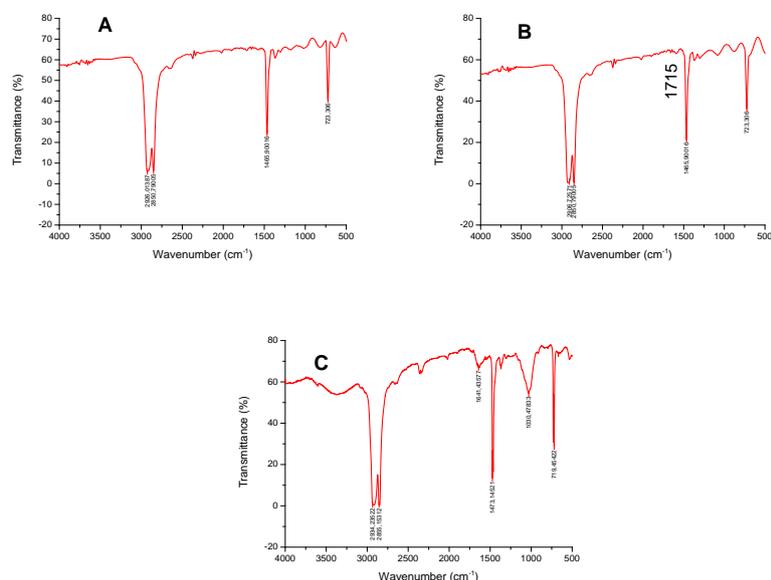


Figura 7.16 Espectros FTIR: (A) PEAD oxodegradable; (B) PEAD oxodegradable fotooxidado inicial; (C) PEAD oxodegradable fotooxidado expuesto 60 días en ambiente marino natural.

La figura 7.16a, muestra el espectro FTIR para el PEAD oxodegradable, el cual coincide con el espectro FTIR de PEAD convencional, descrito en la tabla 7.8, esto ha sido corroborado por otros investigadores (De la Orden *et al.*, 2015). La figura 7.16c, corresponde al espectro del PEAD oxodegradable fotooxidado expuesto 60 días. Tres bandas de absorción son importantes: Una nueva banda formada hacia 1040 cm⁻¹, asignada a tensiones C-O, de grupos éster; un amplio pico hacia 3400, asignada a tensiones de vibración del grupo -OH y una banda hacia 1650 que corresponde a tensiones de insaturación carbono-carbono.

La figura 7.17, muestra el IC, para el proceso de intemperización natural en ambiente marino. El decrecimiento del IC para la muestra PEAD oxodegradable fotooxidado después de 90 días de exposición ha sido atribuido a la formación de ésteres mediante mecanismos tipo Norrish I o Norrish II (Sudhakar *et al.*, 2007).

Estudio de la biodegradabilidad y ecotoxicidad de plásticos oxodegradables

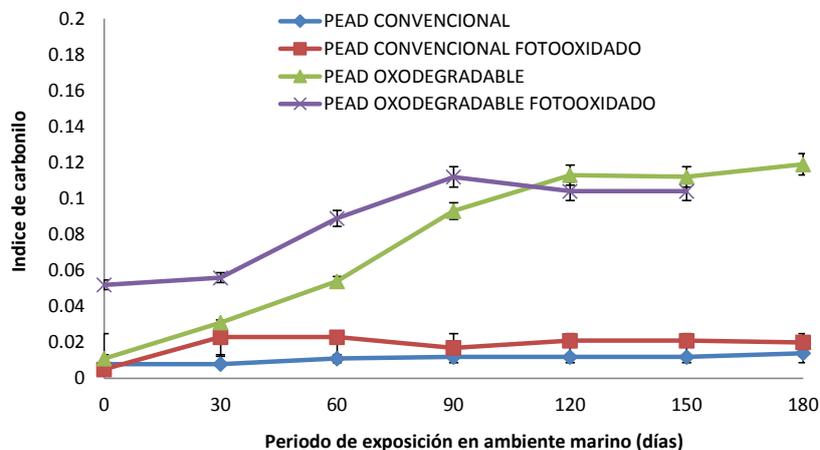


Figura 7.17 IC en función del tiempo para los diferentes plásticos expuestos en ambiente marino.

Un efecto combinado entre la oxidación previa con radiación UV y la incorporación de aditivo prodegradante aumentó la velocidad de fragmentación en las condiciones de exposición en el agua marina, donde la temperatura permanece constante. Se observó además que el IC en el PEAD oxodegradable aumentó progresivamente y fue coherente con el hecho de la pérdida paulatina de las propiedades mecánicas. El aumento del IC fue contrario al comportamiento del porcentaje de elongación. Esta observación fue válida para todas las muestras en la medida que las probetas se desintegraron más fácilmente, en el PEAD oxodegradable fotooxidado, oxodegradable, convencional fotooxidado y convencional, respectivamente. Esto significa que para este caso particular, bajo las condiciones específicas de intemperismo natural, el factor que determinó la degradación, además de la presencia de aditivo prodegradante, fue la fotooxidación previa.

7.3.1.3 Microbiología de la biopelícula en los plásticos estudiados

Se ha sugerido por diversas investigaciones que los microorganismos son capaces de adherirse a la superficie del polímero y formar una biopelícula, segregar diferentes sustancias y desarrollarse sobre la superficie (Sudhakar *et al.*, 2007). El mar Caribe está influenciado por corrientes marinas que depositan nutrientes, ocasionan cambios en la temperatura y en la salinidad del agua, favoreciendo la biodiversidad (Mendoza *et al.*, 2014). Esto se tradujo en el hecho que las trampas expuestas en el mar fueron inmediatamente colonizadas por macroorganismos de diferente taxonomía; se encontraron algas verdes, pardas rojas, platelmintos, moluscos, anélidos, crustáceos e incluso peces. Algunos crustáceos, de la clase *Carcinus*, vulgarmente llamados cangrejos, encontraron en las trampas el lugar para favorecerse de los depredadores y poder reproducirse. De igual manera organismos de la clase *Bivalvia*,

Estudio de la biodegradabilidad y ecotoxicidad de plásticos oxodegradables

conocidos vulgarmente como ostiones, colonizaron tanto las trampas de los plásticos como los soportes de las mismas, de hecho fueron los organismos más invasores (Figura 7.18).



Figura 7.18 Colonización de las trampas de exposición de los plásticos en el medio marino natural.

Esta colonización de organismos superiores permite el desarrollo de un hábitat propicio para el crecimiento de microorganismos, tales como hongos y bacterias. Se encontró que PEAD convencional y oxodegradable exhibieron levemente mayor crecimiento de microorganismos.

Especies encontradas por tipo de material

En las tabla 7.9 y 7.10 se registra el número promedio de bacterias, hongos y levaduras, respectivamente, correspondiente al método de siembra en superficie encontrados para cada material estudiado (NTC 4092, 2009).

Tabla 7.9 Promedio de colonias de bacterias en los plásticos expuestos en ambiente marino.

Clase de polietileno	Resultado UFC/mL
Convencional	$6,1 \times 10^5$
Convencional fotooxidado	$2,4 \times 10^5$
Oxodegradable	$3,2 \times 10^5$
Oxodegradable fotooxidado	$2,7 \times 10^5$
Agua de mar	$1,0 \times 10^3$ < valor estimado

En la Tabla 7.10 se registra el número promedio de mohos y levaduras correspondiente al método de siembra en superficie encontrados para cada plástico estudiado en ambiente marino natural. Se observó que los plásticos sin tratamiento previo de fotooxidación exhibieron el mayor número de colonias viables.

Estudio de la biodegradabilidad y ecotoxicidad de plásticos oxodegradables

Tabla 7.10 Promedio de colonias de mohos y levaduras en los plásticos expuestos en ambiente marino.

Clase de polietileno	Resultado UFC/mL
Convencional	$3,3 \times 10^3$
Convencional fotooxidado	$9,5 \times 10^2$
Oxodegradable	$2,7 \times 10^3$
Oxodegradable fotooxidado	$4,5 \times 10^2$
Agua de mar	$1,0 \times 10^2$

En el Anexo 4 se muestran las características más importantes de las colonias de bacterias encontradas en cada tipo de plástico expuesto en ambiente marino. La figura 7.19, muestra cultivos de bacterias presentes en los plásticos expuestos en condición natural de agua salada para una dilución de 10^3 , para el PEAD convencional y el PEAD convencional fotooxidado. Es necesario aclarar que en este medio también se observó el crecimiento simultáneo de cepas de hongos.

Estudio de la biodegradabilidad y ecotoxicidad de plásticos oxodegradables

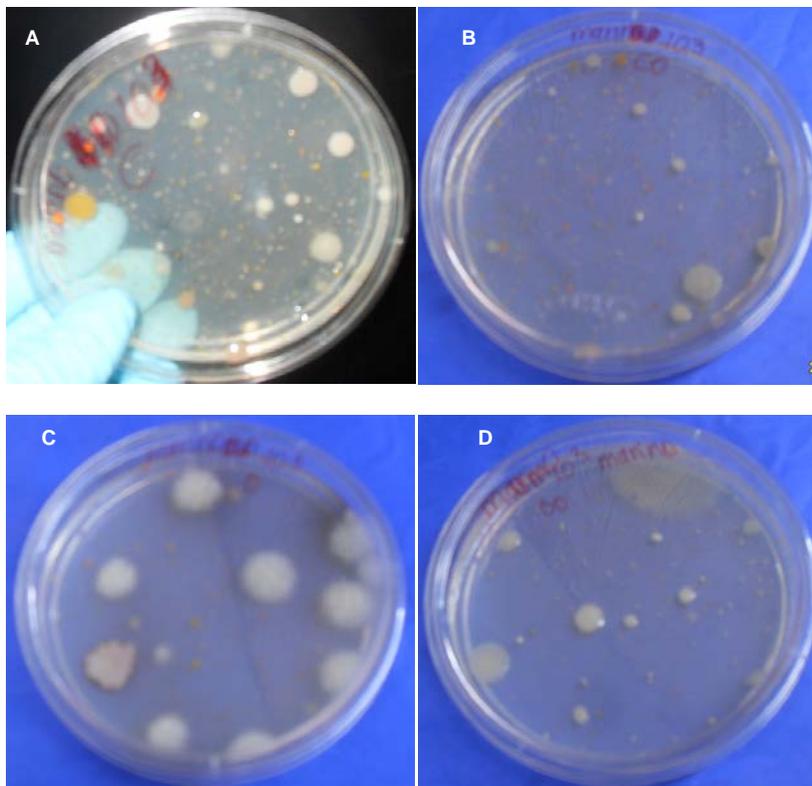


Figura 7.19 Cultivo en agar marino de bacterias en PEAD: (A) convencional; (B) convencional fotooxidado; (C) oxodegradable; (D) oxodegradable fotooxidado.

Es importante la colonización que se presentó por parte de las bacterias. Una gran cantidad de estos microorganismos están presentes en las muestras de los plásticos expuestos; se encontraron colonias policromáticas y polimórficas. Las diluciones para las muestras de agua del lugar de exposición no registraron colonias durante el periodo normal de incubación, por ello se reporta como $<1 \times 10^{-3}$ UFC/mL “valor estimado”; los cultivos correspondientes a las muestras de agua del lugar de exposición, no registraron colonias distinguibles como las que se presentaron en los plásticos, sólo después de una semana se encontró un cultivo extendido de hongos, predominantemente hongo del género *Penicillium* sp (colonias verde pulverulentas). Las bacterias que más frecuentemente fueron encontradas en las muestras de los plásticos son bacilos, en segundo lugar se encuentran cocos (Figura 7.20).

Estudio de la biodegradabilidad y ecotoxicidad de plásticos oxodegradables

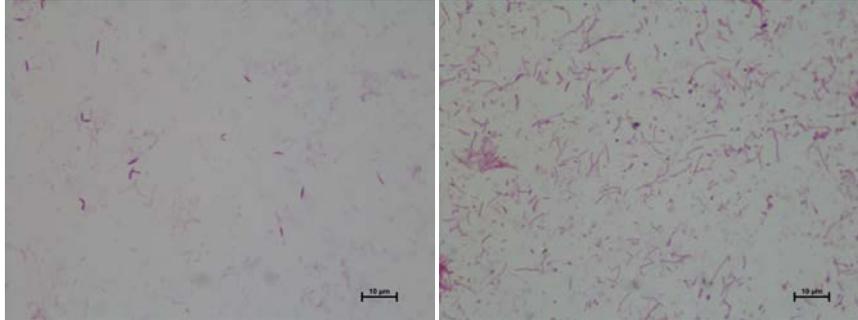


Figura 7.20 *Bacillus* sp Gram positivos encontrados en los plásticos expuestos al ambiente marino.

Los hongos y las levaduras se pueden desarrollar en cualquier ambiente, siendo favorecido su crecimiento en condiciones húmedas y cálidas. Las probetas expuestas en agua de mar natural, se cubrieron por una biopelícula que favoreció la colonización por parte de los microorganismos. La figura 7.21, muestra los cultivos obtenidos de hongos, presentes en los especímenes expuestos en el mar.

Estudio de la biodegradabilidad y ecotoxicidad de plásticos oxodegradables

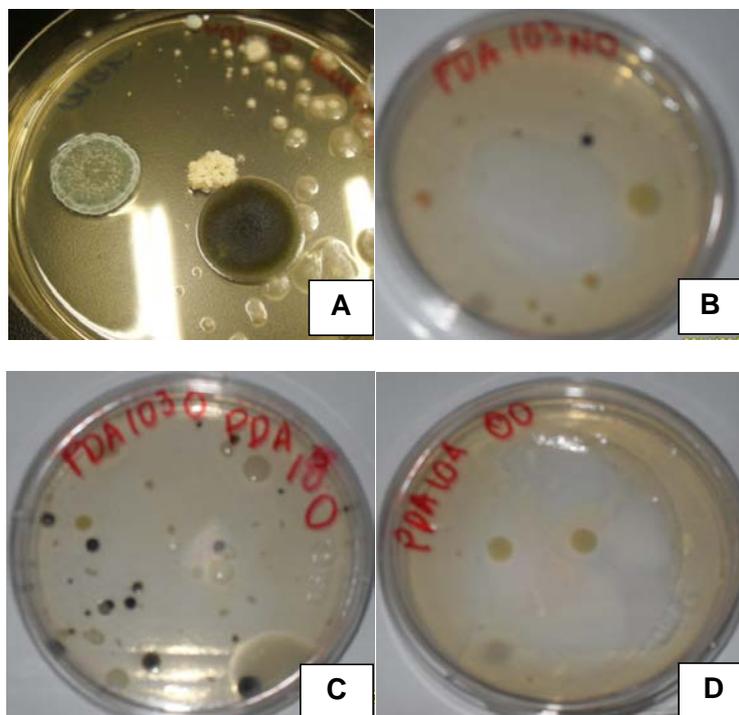


Figura 7.21 Cultivos microbianos (hongos) obtenidos en los diferentes PEAD expuestos en ambiente marino: (A) convencional; (B) convencional fotooxidado; (C) oxodegradable; (D) oxodegradable fotooxidado.

Las colonias de levaduras se encontraron presentes tanto en los cultivos de agar marino como en los de agar PDA, ellas son colonias con mucho brillo y mucosas. Diferentes clases de hongos se pueden observar en las cajas Petri. Se identificaron los géneros *Aspergillus* sp, *Penicillium* sp y *Zygomycota* sp; sin embargo otras especies están presentes y no fueron identificadas. Estas mismas especies fueron reportadas por Sudhakar *et al.*, (2008); en su trabajo reportó específicamente *Aspergillus niger*, *Aspergillus flavus*, *Aspergillus oryzae*, *Chaetomium globosum*, *Penicillium funiculosum*, *Pullularia pullulans*; además reportaron las bacterias *Pseudomonas aeruginosa*, *Bacillus cereus*, *Coryneformes bacterium* y *Bacillus* sp.

La tabla 7.11, resume los microorganismos identificados en los plásticos expuestos en ambiente marino. Para los hongos se observaron sus características morfológicas y prueba de tinción con lactofenol y para las bacterias se hicieron ensayos con BBL Crystal® para la identificación.

Estudio de la biodegradabilidad y ecotoxicidad de plásticos oxodegradables

Tabla 7.11 Identificación de poblaciones microbianas presentes en los plásticos expuestos en ambiente acuoso marino.

Microorganismo	Descripción
Levaduras	Presentes en todas las muestras
Bacterias	<i>Aeromonas caviae</i> <i>Bacillus subtilis</i> <i>Bacillus cereus</i> <i>Bacillus megaterium</i> <i>Pseudomonas aeruginosa</i> <i>Micrococcus</i>
Hongos	
Género <i>Aspergillus</i>	<i>Aspergillus</i> sp
Género <i>Penicillium</i>	<i>Penicillium</i> sp
Género <i>Zygomycota</i>	<i>Zygomycota</i> sp
Otros (Géneros no identificados)	

La figura 7.22 corresponde a micrografías de microcultivos de cepas de hongos encontradas con mayor frecuencia en los plásticos expuestos en ambiente marino.

Estudio de la biodegradabilidad y ecotoxicidad de plásticos oxodegradables

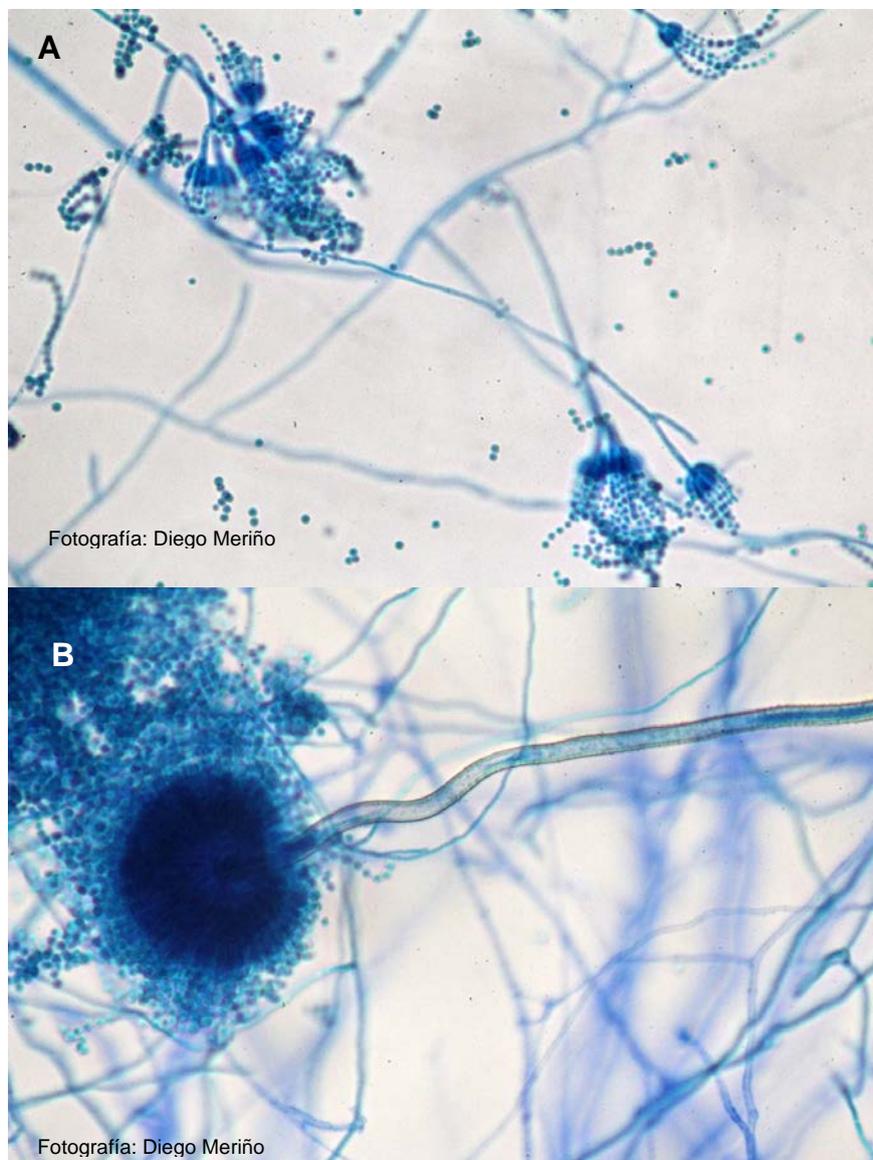


Figura 7.22 Estructura microscópica de las especies encontradas tanto en probetas de PEAD convencional y oxodegradable expuestas en ambiente marino natural: (A) *Penicillium* sp, (B) *Aspergillus* sp.

Los géneros *Penicillium* sp y *Aspergillus* sp, se encontraron en la mayoría de las muestras de los plásticos y también en las muestras de agua marina.

Estudio de la biodegradabilidad y ecotoxicidad de plásticos oxodegradables

7.3.2 Ambiente de agua dulce

Se describirán brevemente las principales características del agua del río, para muestras puntuales de control.

7.3.2.1 Características del agua dulce (río)

Durante el periodo de muestreo se registraron los valores de temperatura, conductividad, pH y oxígeno disuelto del agua del río en el lugar de exposición de las muestras. En la tabla 7.12, se reportan los valores promedio para los muestreos de calidad del agua del río monitoreados durante los seis meses de exposición de los plásticos.

Tabla 7.12 Valores promedio para los parámetros de calidad del agua dulce durante los meses de exposición en el Río Magdalena, lugar Las Flores (Barranquilla, Atlántico).

Parámetro	Valor
Temperatura (°C)	27,6 ± 0,5
pH	7,39 ± 0,12
Oxígeno disuelto (mg.L ⁻¹)	4,74 ± 1,3
Conductividad (μS.cm ⁻¹)	177,5 ± 6,2

Los resultados de la tabla 7.12 corresponden a valores típicos de agua de río, que permiten el desarrollo de la flora y la fauna. La Red de Vigilancia para la Conservación y Protección de las Aguas Marinas y Costeras de Colombia (REDCAM) en su informe del año 2014, estableció que el Índice de Calidad es aceptable porque se ve afectada por vertimientos con alto contenido de nutrientes, sólidos suspendidos y sedimentos. Los valores más críticos de cuerpos de agua dulce los muestra el Río Magdalena, en la estación de monitoreo de la Base Naval, sobre todo por el alto contenido de fosfato, nitritos, nitratos y amonio; alta cantidad de hidrocarburos y un gran aporte de microorganismos que encuentran las condiciones apropiadas para su desarrollo; por tanto, el agua no cumple especificaciones para contacto primario. Se resalta como aspecto positivo el bajo contenido de metales pesados y plaguicidas organoclorados (Sánchez *et al.*, 2014).

La caracterización específica del agua dulce, para una muestra puntual, se encuentran en la tabla 7.13.

Estudio de la biodegradabilidad y ecotoxicidad de plásticos oxodegradables

Tabla 7.13 Caracterización del agua dulce de una muestra puntual en Las Flores (Atlántico, Col.).

Parámetro	Unidad	Resultado	Norma
pH	Unidades de pH	7,31	ASTM 4500 HTB
Temperatura	°C	27,5	ASTM 2550B
Cloruros	mg.L ⁻¹ Cl ⁻	28,36	ASTM 14180B
Sulfatos	mg.L ⁻¹ SO ₄ ⁻	29,46	ASMT 4500C
Conductividad	μS/cm	186,2	ASTM 2510B
Color aparente	UPtCo	119,9	ASTM 2120B
Turbiedad	NTU	185	ASTM 2130B
Hierro	mg.L ⁻¹ Fe ⁻	0,12	ASTM 3500B
Nitratos	mg.L ⁻¹ NO ₃ ⁻	2,0	ASTM 4500NO ₃ B
Nitritos	mg.L ⁻¹ NO ₂ ⁻	0,156	ASTM 4500NO ₂ B
Alcalinidad Total	mg.L ⁻¹ CaCO ₃ ⁻	116	ASTM 2320B
Dureza Total	mg.L ⁻¹ CaCO ₃ ⁻	54,2	ASTM 2340B
Dureza cálcica	mg.L ⁻¹ CaCO ₃ ⁻	26	ASTM 2340B
Sólidos totales	mg.L ⁻¹	342,5	ASTM 2540B
Sólidos suspendidos	mg.L ⁻¹	141,1	ASTM 2540B

7.3.2.1 Evaluación de la degradación

La inspección visual de los materiales se muestra como evidencia de degradación durante todo el periodo de observación.

Inspección visual

Las figuras 7.23 a 7.26, compara el material original con respecto a la biopelícula depositada en las probetas expuestas 30 y 180 días en ambiente de agua dulce.

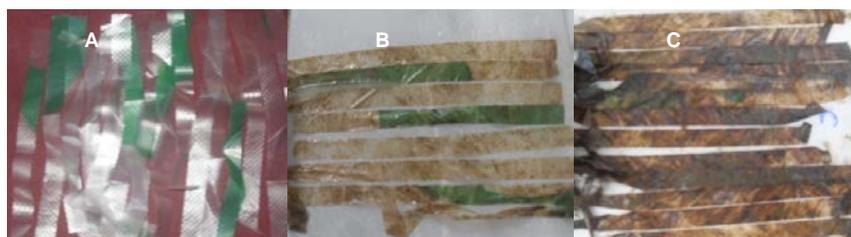


Figura 7.23 Registro fotográfico de la biopelícula en PEAD convencional: (A) sin exposición; expuesto en ambiente natural de agua dulce: (B) 30 días, (C) 180 días.

La figura 7.23, muestra la formación de biopelícula para el material convencional expuesto 30 días y 180 días, se observó un aumento de la cantidad de limo, organismos vivos y otros

Estudio de la biodegradabilidad y ecotoxicidad de plásticos oxodegradables

residuos, que en general se conocen como biopelícula. El PEAD convencional fotooxidado presenta un comportamiento similar (Figura 7.24).



Figura 7.24 Registro fotográfico de la biopelícula en PEAD convencional fotooxidado: (A) sin exposición; expuesto en ambiente natural de agua dulce: (B) 30 días, (C) 180 días.

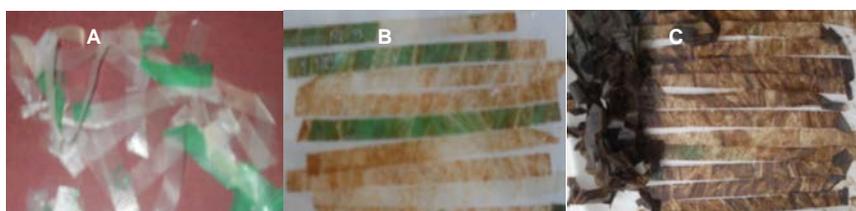


Figura 7.25 Registro fotográfico de la biopelícula en PEAD oxodegradable: (A) sin exposición; expuesto en ambiente natural de agua dulce: (B) 30 días, (C) 180 días.

La figura 7.26 muestra un comparativo entre película original del plástico PEAD oxodegradable fotooxidado y la biopelícula formada después de expuesto en el río. Se observó que hay deterioro, pues se encontró rasgado de algunas probetas.



Figura 7.26 Registro fotográfico de la biopelícula en PEAD oxodegradable fotooxidado: (A) sin exposición; expuesto en ambiente natural de agua dulce: (B) 30 días, (C) 180 días.

Las marcas (pliegues) encontradas en todas las muestras expuestas en el río se atribuyen al oleaje fuerte que se presenta en el lugar de exposición, estas aparentes marcas permiten inferir que existen fuerzas mecánicas que pudieron incidir en el deterioro del material.

Las figuras de la 7.27 a 7.30, muestran una secuencia de micrografías de las probetas, tomadas una vez finalizó la exposición (después de 180 días) en agua dulce, para los materiales PEAD convencional, PEAD convencional fotooxidado, PEAD oxodegradable, PEAD oxodegradable fotooxidado, respectivamente. Las microfotografías (observación a 100 μm) permitieron reconocer los cambios ocurridos después de remover la biopelícula formada. La

Estudio de la biodegradabilidad y ecotoxicidad de plásticos oxodegradables

primera de las tres corresponde al material original, y las dos imágenes siguientes contrastan probetas expuestas durante 180 días, con la menor y la mayor afectación visual observable.

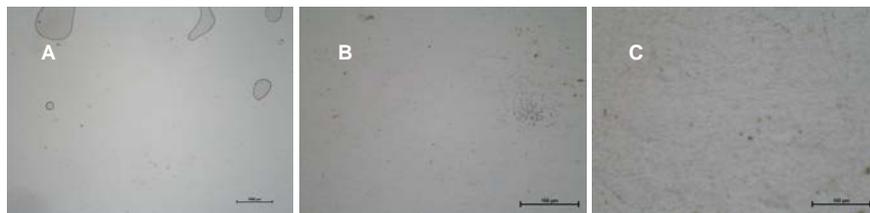


Figura 7.27 Fotomicrografía de PEAD convencional: (a) sin exposición; expuesto 180 días en ambiente natural de agua dulce: (b) sin afectación observable; (c) con afectación observable.

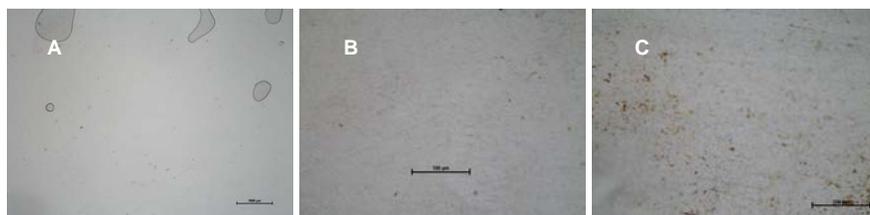


Figura 7.28 Fotomicrografía de PEAD convencional: (A) sin exposición; expuesto 180 días en ambiente natural de agua dulce: (B) sin afectación observable; (C) con afectación observable.

Se observa formación de biopelícula, que puede ser removida casi en su totalidad. No se evidencian orificios o grietas. El comportamiento es similar para el PEAD convencional fotooxidado.

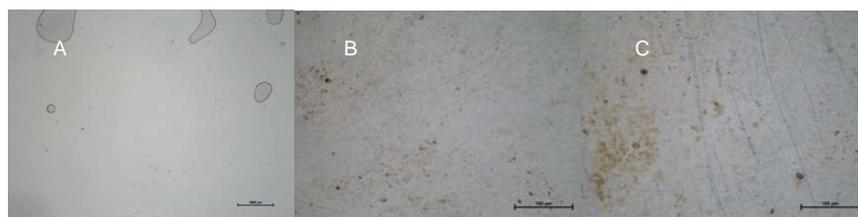


Figura 7.29 Fotomicrografía de PEAD oxodegradable: (A) sin exposición; expuesto 180 días en ambiente natural de agua dulce: (B) sin afectación observable; (C) con afectación observable.

La figura 7.29, no muestra cambios evidentes que indiquen que ocurrió degradación del plástico PEAD oxodegradable; se observa un ligero aumento de la cantidad de biopelícula formada, que no es posible retirarla después de la aplicación de surfactante.

Estudio de la biodegradabilidad y ecotoxicidad de plásticos oxodegradables

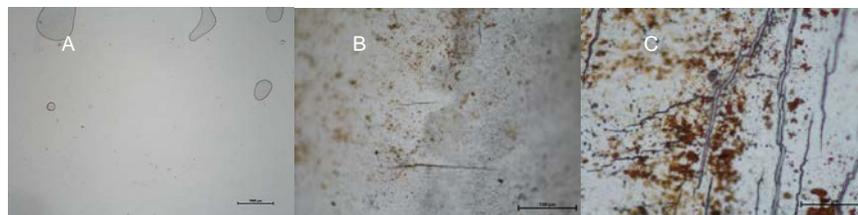


Figura 7.30 Fotomicrografía de PEAD oxodegradable fotooxidado: (A) sin exposición; (B) expuesto 180 días en ambiente natural de agua dulce: sin afectación observable; (C) con afectación observable.

Las probetas de PEAD oxodegradable fotooxidado exhiben grietas y agujeros, a partir del tercer mes de exposición (Figura 7.30); además se fracturaron fácilmente cuando fueron manipuladas después del quinto mes. La particularidad de este comportamiento se atribuye a la previa oxidación producida en la cámara de intemperismo, que al juzgar por estos resultados produjo daños irreversibles en las cadenas del polímero, cambios a nivel molecular, tales como la ruptura de las cadenas poliméricas que se traducen en menores masas moleculares y en consecuencia las propiedades físico-mecánicas del material se ven afectadas.

Pérdida de masa

Los valores mostrados en la tabla 7.14 presentan la pérdida de masa después de seis meses de tratamiento. La cantidad de biopelícula adherida a los plásticos expuestos en el agua dulce fue más fácil de remover. Todas las probetas presentaron biopelícula, sin embargo, no hay presencia de especies tales como algas, anélidos, cangrejos y otros crustáceos.

Tabla 7.14 Pérdida de masa de los plásticos estudiados en ambiente de agua dulce, comparando valor inicial con valor a 180 días de exposición.

Tipo de muestra	Masa inicial (g)	Masa final (g)	Porcentaje de pérdida
PEAD convencional	0,0234 ± 0,0011	0,0234 ± 0,0011	0
PEAD convencional fotooxidado	0,0238 ± 0,0011	0,0235 ± 0,0011	0,08
PEAD oxodegradable	0,0236 ± 0,0011	0,0240 ± 0,0011	1,6
PEAD oxodegradable fotooxidado	0,0238 ± 0,0011	-	No determinado

Propiedades mecánicas: elongación a la ruptura

Una película de PE alcanzó valores de porcentaje de elongación de 500% o más. Después de una reducción significativa de la masa molar resultante de la peroxidación, dicha propiedad

Estudio de la biodegradabilidad y ecotoxicidad de plásticos oxodegradables

habrá disminuido drásticamente, hasta valores inferiores al 5% de elongación a la ruptura de la película original y en consecuencia el material se tornó frágil y sufrió fragmentación.

Se encontró que para el PEAD oxodegradable previamente fotooxidado no fue posible evaluar la elongación a la ruptura desde el primer mes de exposición. El PEAD oxodegradable sin oxidación previa perdió sus propiedades mecánicas después de tres meses de exposición, mientras que el convencional lo hizo después del mes cuarto de exposición. La Figura 7.31, muestra los valores encontrados para las probetas expuestas en el río.

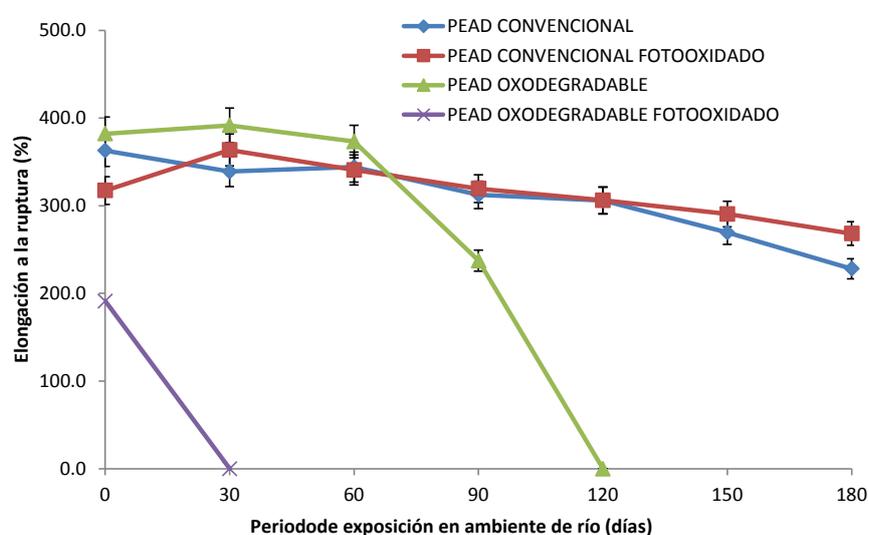


Figura 7.31 Línea de tendencia de las mediciones de porcentaje de elongación para las muestras expuestas en ambiente natural de agua dulce durante 180 días.

Se observó que tanto el PEAD convencional y convencional fotooxidado, después de 180 días disminuyen las propiedades mecánicas. Por otro lado, el PEAD oxodegradable no registra elongación a la ruptura después de 120 días de exposición. El PEAD oxodegradable fotooxidado no registra elongación a la ruptura a partir de 30 días de exposición, además las probetas son muy frágiles y en ocasiones se desintegran durante la manipulación.

Análisis estadístico de porcentaje de elongación a la ruptura para los materiales expuestos en ambiente de agua dulce (Río Magdalena)

Cabe recordar que en el apartado 7.2 se reportó el análisis estadístico para los materiales de partida. En esta sesión se muestra cómo se comportan los plásticos en el ambiente de agua dulce, se quiere observar si ocurrió degradación de los plásticos y si ellos siguieron un patrón específico en estas condiciones. El PEAD oxodegradable, que es el material de interés en esta investigación se comparó con los demás materiales. En primera instancia se analizaron

Estudio de la biodegradabilidad y ecotoxicidad de plásticos oxodegradables

los datos conjuntos para 180 días de exposición. Con datos normales se hizo el análisis de varianza y se encontró que el estadístico F es 3,31 y P es igual a 0,049, como este valor es menor a 0,05, se encuentra que los plásticos en el agua del río se degradan en forma diferenciada en el tiempo. De la prueba de comparaciones de Tukey se encuentra que el plástico PEAD oxodegradable fotooxidado exhibe diferencias significativas con respecto a los demás materiales para un nivel de confianza de 95% (Anexo A6-1). Además el análisis de residuos de los datos no muestra indicios de violación de validez de la prueba (Anexo A6-2).

Análisis de varianza de porcentaje de elongación para cada mes en agua dulce

Los datos de porcentaje de elongación a la ruptura tomados para los seis meses de exposición fueron normalizados aplicando la prueba de AD. En la tabla 7.15 se muestra análisis de varianza para los materiales expuestos en el agua dulce (río), desde el mes 1 hasta el mes 6.

Tabla 7.15 Análisis de varianza para porcentaje de elongación de los materiales expuestos en el río para cada mes de exposición.

Tiempo de exposición (Mes)	Grados de libertad	Valor F	Valor P
1	2	9,49	0,000
2	2	2,58	0,085
3	2	6,11	0,005
4	1	0,13	0,719
5	1	1,55	0,221
6	1	5,28	0,029

La evidencia muestra mediante ANOVA con un nivel de confianza del 95% que existieron diferencias estadísticamente significativas entre los plásticos al ser tratados en ambiente de agua dulce a los 30, 90 y 180 días de exposición; esto significa que no hay un patrón homogéneo de comportamiento al ser tratados en el ambiente río.

Prueba de comparaciones múltiples para ambiente de agua dulce

La prueba Tukey (Anexo A6-1 a A6-5), muestra que existieron diferencias significativas entre los materiales expuestos en el ambiente de agua dulce. Se encontró que para 30 y 90 días el PEAD oxodegradable es significativamente diferente a PEAD convencional y PEAD convencional fotooxidado. A 180 días de exposición son diferentes significativamente a un nivel de confianza de 95%, el PEAD convencional con respecto al PEAD convencional fotooxidado.

Estudio de la biodegradabilidad y ecotoxicidad de plásticos oxodegradables

Para periodos de exposición de 120 y 150 los materiales no exhibieron diferencias significativas.

Determinación de cambios estructurales mediante espectroscopia FTIR

Como evidencia de los cambios químicos, debidos a la intemperización en condiciones de exposición en ambiente natural de agua dulce (río), se registraron las frecuencias de absorción correspondientes. Los datos de la tabla 7.16 muestran las absorciones típicas de los materiales sin exposición vs los materiales expuestos en el río.

Tabla 7.16 Principales bandas de absorción FTIR de PEAD oxodegradable expuesto 180 días en ambiente natural de agua dulce.

Tipo de Absorción	Absorción Inicial (cm ⁻¹)	Absorción final (cm ⁻¹)
Deformación –C-H (metilo)	2928 (2880-2975)	2930 (2880-2975)
Deformación–C-H (metilo asimétrico)	1472 (m) δ C-H asimétrico	1472 (δ C-H asimétrico)
Deformación asimétrica de –CH ₂	2855	2855
Tensión de vibración –OH	Ausente	Ausente
Tensión C-O	Ausente	1070
Tensión C=C (olefinas), conjugado con -C=O	Ausente	1600
Tensión C-H (olefinas)	Ausente	3010-3095
Tensión C=O	Ausente	1750 (débil)

Los espectros FTIR de la figura 7.32, corresponden al material control, PEAD convencional y oxodegradable sin exposición. Los cambios más notables se observaron, como era de esperarse, para el PEAD oxodegradable fotooxidado, del que se muestra, a manera de ejemplo, el espectro después de 60 días de exposición en el río.

Estudio de la biodegradabilidad y ecotoxicidad de plásticos oxodegradables

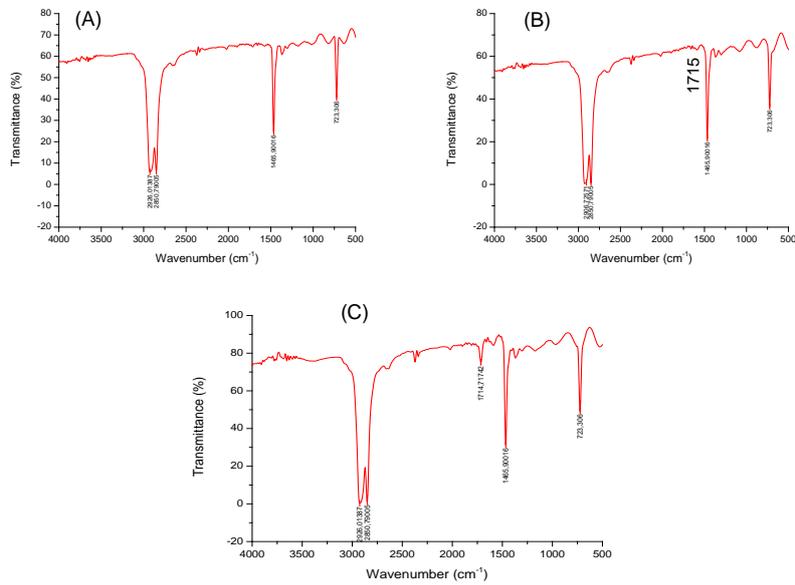


Figura 7.32 Espectros FTIR: (A) PEAD Oxodegradable; (B) PEAD oxodegradable fotooxidado inicial; (C) PEAD oxodegradable fotooxidado expuesto 60 días en río.

La figura 7.33 muestra el IC para los diferentes plásticos expuestos en ambiente natural de agua dulce.

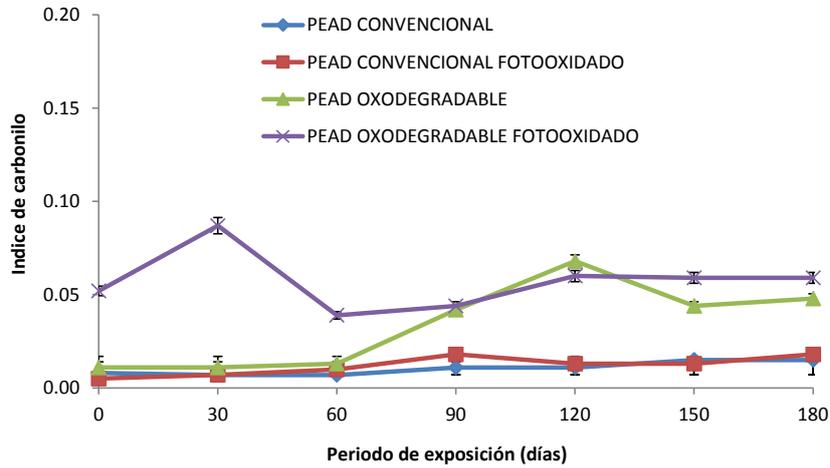


Figura 7.33 IC en función del tiempo para los diferentes PEAD expuestos en ambiente natural de agua dulce.

Estudio de la biodegradabilidad y ecotoxicidad de plásticos oxodegradables

De la figura 7.33 se observó un incremento del IC en el PEAD oxodegradable fotooxidado que no supera el valor de 0,09, con un pico que indica que el proceso de fotooxidación continuó hasta los 30 primeros días, cuando aún la cantidad de biopelícula es baja, lo que facilita la absorción de radiación natural. La temperatura del medio no presentó variaciones inusitadas, situación que permite inferir que el factor determinante de la oxidación fue la radiación. Las probetas de PEAD oxodegradable muestran un patrón de comportamiento similar inicial y luego una leve tendencia a la baja, y continúan relativamente constantes, parece indicar que la formación de la biopelícula disminuyó la absorción de la radiación, y se infiere que disminuye la tasa de oxidación.

7.3.2.2 Microbiología de la biopelícula en los plásticos estudiados

Como se observa en la figura 7.34, la cantidad de biopelícula sobre las trampas y en las probetas de los plásticos fue muy baja. El Río Magdalena, lugar de exposición de las trampas, es un río que exhibe contaminación de diferentes fuentes. La industria y las poblaciones de sus orillas vierten residuos sólidos y líquidos consecuentemente afectando la biodiversidad de este ecosistema de manera negativa.



Figura 7.34 Fotografía de las trampas en el lugar de exposición (Río Magdalena).

Tradicionalmente este río ha sido explotado para la pesca, sin embargo, esta actividad ha decaído en los últimos años, sobre todo en los últimos kilómetros antes de su desembocadura en el Mar Caribe (lugar de exposición). No se observó macrofauna, ocasionalmente se depositó sobre las trampas *Eichhornia crassipes*, vulgarmente llamado Jacinto de agua, que es arrastrado por la corriente del río.

Es semejante la cantidad de biopelícula en las probetas de todos los plásticos expuestas en medio de agua dulce. La tabla 7.17, muestra el conteo promedio de las colonias de bacterias encontradas en las probetas expuestas en el río después de 180 días. En la dilución 10^{-3} , se encontró sólo una colonia en la muestra de agua, por tanto el valor estimado es inferior a 1000 UFC/mL. La mayoría de las colonias de bacterias tienen apariencia mucoide. La lectura se

Estudio de la biodegradabilidad y ecotoxicidad de plásticos oxodegradables

tomó a 48 horas, puesto que a las 24 horas no se registró un crecimiento apreciable de las colonias. El Anexo A7, contiene la información de las principales características morfológicas de las colonias encontradas en cada tipo de plástico expuesto en agua dulce natural

Tabla 7.17 Promedio de colonias de bacterias en los plásticos expuestos en el río.

Clase de polietileno	Resultado UFC/mL
Convencional	2,8x10 ³
Convencional fotooxidado	5,1x10 ³
Oxodegradable	1,8x10 ³
Oxodegradable fotooxidado	1,1x10 ³
Agua de río	1,7x10 ⁴

La tabla 7.18 muestra el conteo de hongos en muestras de agua de río y los cuatro plásticos expuestos en ambiente de agua dulce, de las dos réplicas hechas se tomó el promedio de número de colonias presente en la caja Petri. La columna UFC/mL muestra la información del número de colonias en la dilución que tenga el menor número de colonias replicables, conservando la diversidad.

Tabla 7.18 Promedio de colonias de hongos y levaduras en los plásticos expuestos en ambiente de agua dulce.

Clase de polietileno	Resultado UFC/mL
Convencional	3,3x10 ³
Convencional fotooxidado	1,1x10 ³
Oxodegradable	1,6x10 ³
Oxodegradable fotooxidado	1,2x10 ³
Agua de río	<10 ²

La tabla 7.18, presenta el conteo de colonias de hongos bajo los términos de la metodología planteada. Teniendo en cuenta que el crecimiento de los microorganismos fue bajo para la tercera dilución (10³), se extendió el tiempo de incubación logrando el crecimiento de nuevas colonias y el desarrollo de las existentes. En el caso de PEAD oxodegradable fotooxidado los

Estudio de la biodegradabilidad y ecotoxicidad de plásticos oxodegradables

mohos se desarrollaron después del día 12 de incubación en laboratorio. Colonias de algunas cepas de hongos aislados, se muestran en la figura 7.35. Ejemplo de cepas de bacterias encontradas en las probetas analizadas se registran en la fotomicrografía de la figura 7.36.

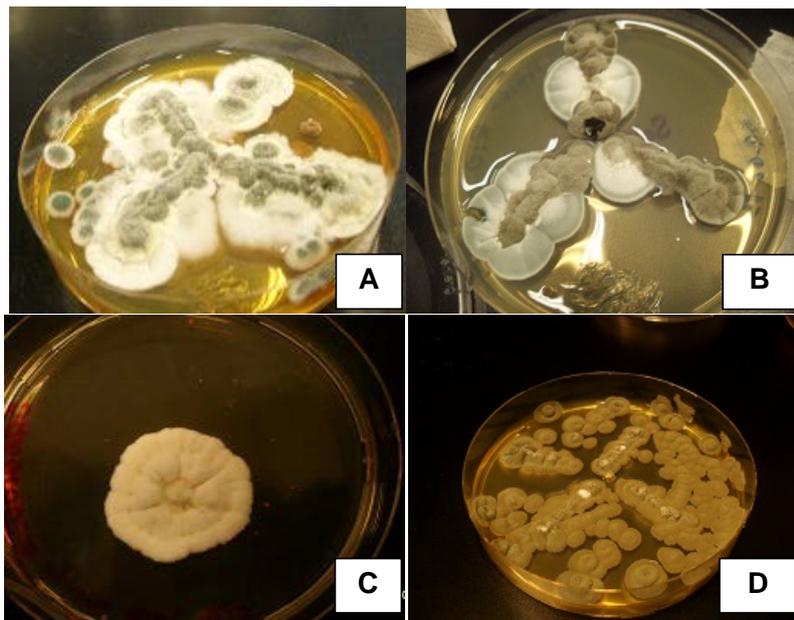


Figura 7.35 Cultivos de hongos de las muestras expuestas en ambiente de agua dulce: (A), (B), (C) género *Aspergillus* y (D) género *Penicillium*.

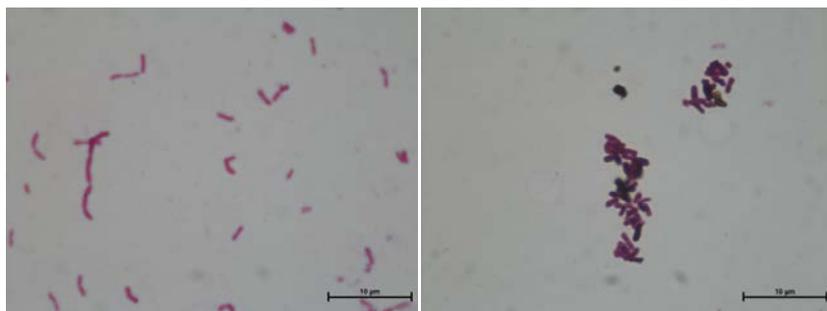


Figura 7.36 Fotomicrografía de bacterias encontradas en los plásticos expuestos en el río.

La tabla 7.19 resume los microorganismos identificados en los plásticos expuestos en ambiente de agua dulce. Se observaron sus características morfológicas, se realizó la prueba de tinción con lactofenol para hongos y se hicieron los ensayos con BBL Crystal®, para bacterias.

Estudio de la biodegradabilidad y ecotoxicidad de plásticos oxodegradables

Tabla 7.19 Identificación de poblaciones microbianas presentes en los plásticos expuestos en ambiente acuoso de río.

Microorganismo	Descripción
Levaduras	Presentes en todas las muestras
Bacterias	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i> <i>Enterobacter</i> Bacilo pleomórfico <i>Micrococcus</i>
Hongos	
Genero <i>Aspergillus</i>	<i>Aspergillus</i> sp
Género <i>Penicillium</i>	<i>Penicillium</i> sp
Género <i>Zygomycota</i>	<i>Zygomycota</i> sp

Para las colonias más frecuentemente encontradas se hicieron microcultivos. La identificación morfológica a través de registro microfotográfico de estructuras de *Aspergillus* sp y *Penicillium* sp, se muestra en la figura 7.37.

Estudio de la biodegradabilidad y ecotoxicidad de plásticos oxodegradables

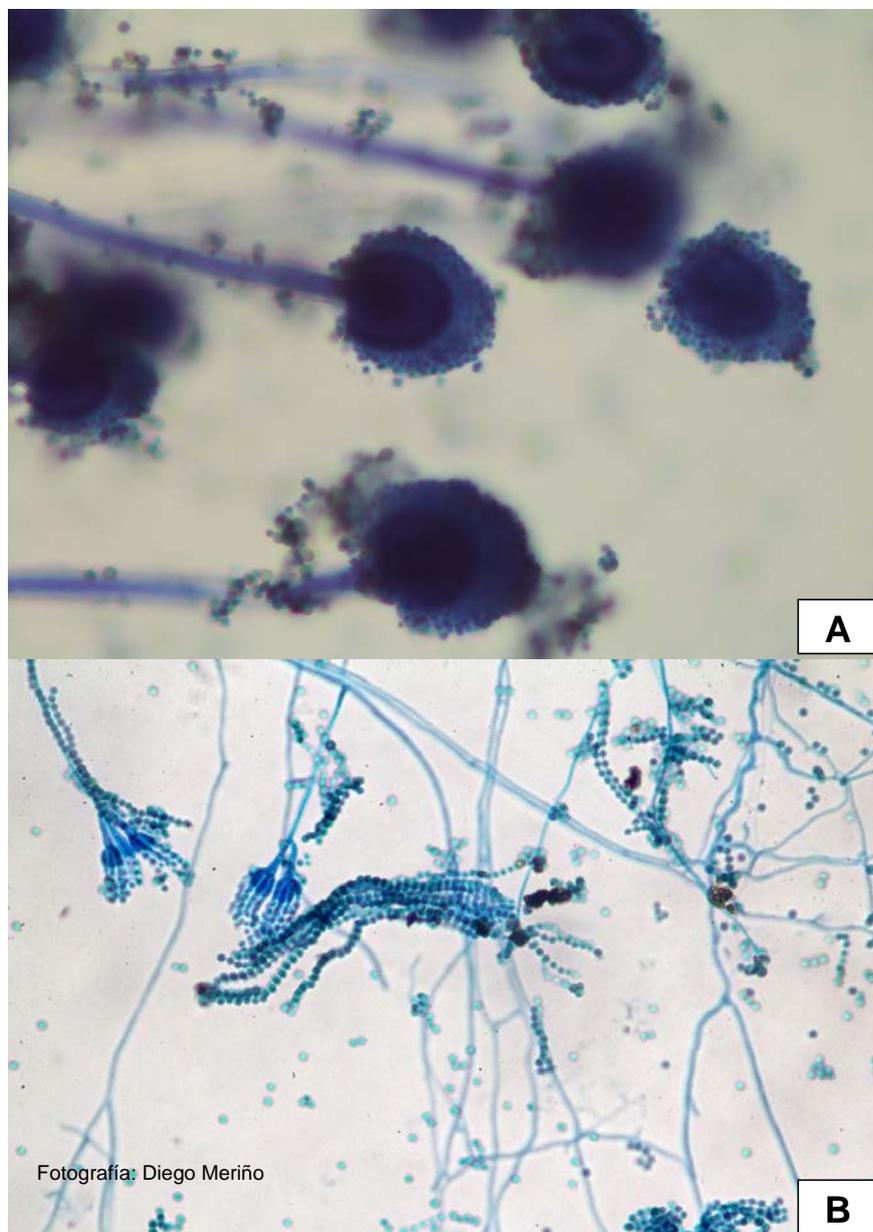


Figura 7.37 Estructura microscópica de las especies encontradas tanto en probetas de PEAD convencional como en PEAD oxodegradable expuestas en ambiente de agua dulce natural: (A) *Aspergillus* sp; (B) *Penicillium* sp.

Estudio de la biodegradabilidad y ecotoxicidad de plásticos oxodegradables

7.3.3 Comparación de la degradación en los dos ambientes

Brevemente se hace un comparativo entre los dos ambientes. Al comparar los valores de los diferentes parámetros del agua de río con el agua de mar se observó que los valores de temperatura sólo presentan una diferencia de aproximadamente dos grados; se sabe que la cinética de las reacciones químicas es dependiente de la temperatura, sin embargo, dos grados no podrían determinar que el proceso de degradación evidenciado en la probetas expuestas en el mar sea atribuible a esta diferencia; por ello se buscó juzgar otros parámetros que pudieron incidir en la degradación. Uno de estos parámetros es el contenido de biopelícula, se observó que en las probetas expuestas en el río fue menor (aproximadamente cinco veces) y más fácilmente removible con respecto a las probetas expuestas en el mar.

En las probetas expuestas en el río, la presencia de crustáceos fue baja, situación esperada debido a que el contenido de calcio es menor en agua dulce del río comparado con el agua marina. La figura 7.38 es un comparativo de la biopelícula formada en los dos ambientes; se observó una gran cantidad de especies colonizadoras de las probetas marinas (crustáceos, algas, entre otros), situación que no se registró en el río.



Figura 7.38 Comparativo de la formación de biopelícula. Especies adheridas en las probetas expuestas en el mar: Ostiones (A), algas (B). Expuestas en el río: depósito de limo del río (C, D).

Otro factor importante y diferenciador entre el comportamiento de los plásticos en ambiente marino y de agua dulce, se refiere a la turbulencia. En el río es muy fuerte y produce un patrón transversal de formación de biopelícula que no se encontró en las probetas del mar; el pliegue formado en las probetas se encontró principalmente en los materiales no oxidados, mientras

Estudio de la biodegradabilidad y ecotoxicidad de plásticos oxodegradables

que el PEAD convencional fotooxidado se ensortija en forma de hélices que dificultan su manipulación.

Además se observó que el material PEAD oxodegradable previamente fotooxidado se fragmentó más rápidamente en condiciones de agua marina que en el agua dulce. Las probetas expuestas en el río mayoritariamente retuvieron su integridad hasta los 180 días.

7.3.1.1 Elongación a la ruptura

La tendencia comparativa en el comportamiento hacia la degradación entre materiales y entre medios, teniendo en cuenta la elongación a la ruptura, se muestra en la figura 7.39.

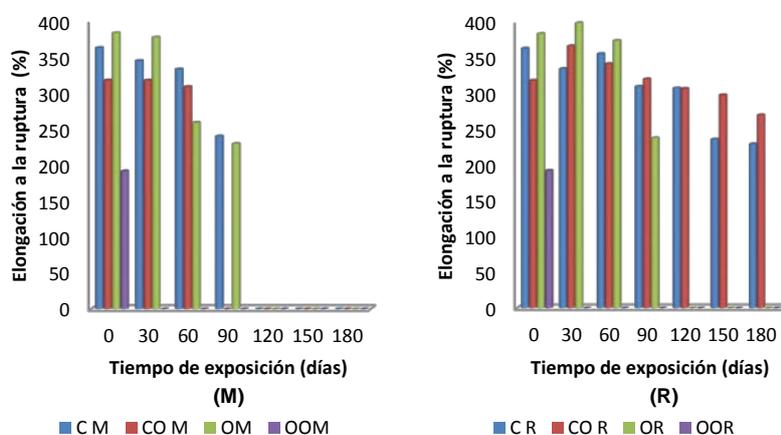


Figura 7.39 Tendencia comparativa del porcentaje de elongación en ambiente marino (M, izquierda) y ambiente de Río (R, derecha): PEAD convencional (C); PEAD convencional fotooxidado (CO); PEAD oxodegradable (O); PEAD oxodegradable fotooxidado (OO).

La figura 7.39 permite inferir que existieron marcadas diferencias en el porcentaje de elongación entre las probetas expuestas en los dos ambientes. Se observa que el PEAD oxodegradable para los tres primeros meses de exposición tiene comportamiento semejante en los dos medios, mientras que las muestras de PEAD convencional expuestas en el mar durante el primer trimestre de exposición, disminuyeron su porcentaje de elongación desde valores próximos a 400% hasta valores cercanos a 200%, mientras en agua dulce mantienen sus valores en el rango entre 400% y 300% para el mismo periodo de tiempo. Se observó que los materiales PEAD convencional sin y con fotooxidación, mantienen sus propiedades mecánicas hasta el final de la exposición en el río, mientras que en el mar sólo lo hacen hasta el cuarto mes. Así mismo, se puede establecer que para 180 días de exposición, los materiales mostraron una tendencia hacia la pérdida completa de las propiedades mecánicas (porcentaje de elongación a la ruptura) independientemente del medio en el cual se encontraban. Particularmente el PEAD oxodegradable presentó, en ambos medios, valores de porcentaje de

Estudio de la biodegradabilidad y ecotoxicidad de plásticos oxodegradables

elongación a la ruptura muy semejantes hasta 90 días de exposición, después de este tiempo fue imposible el registro del porcentaje de elongación. Así que para 90 días de exposición, la mayoría de los materiales aún registraron valores de elongación y por tanto es interesante conocer si el medio influyó en la degradación de los materiales.

Para establecer si existieron diferencias significativas entre los materiales o entre los distintos ambientes se desarrolló análisis estadístico, teniendo en cuenta las medias de porcentaje de elongación. La razón para seleccionar las medias es debido a que los materiales utilizados, bolsas de supermercado de PEAD convencional y PEAD oxodegradable, son materiales en los que se admite una variabilidad grande de sus propiedades, dado que además de los parámetros de los procesos de producción ellos son fabricados con aproximadamente un 10% de resinas recicladas.

Los datos de elongación se analizaron y filtraron, para proceder a desarrollar las pruebas de significancia, que se mostrarán en los apartados siguientes. Se ejecutó el análisis estadístico de los plásticos sin exposición en medio natural y posteriormente se compararon en diferentes periodos de tiempo.

Pruebas estadísticas para los materiales sin exposición.

El primer paso fue la normalización de los valores de elongación a la ruptura de los materiales de partida, se utilizó la prueba de AD observando valor- $P > 0,05$. Siendo normales los datos se procede a realizar una prueba de análisis de varianza para un nivel de 95% de confianza, encontrando que hay diferencias de acuerdo a la tabla 7.20, la cual contiene el resumen estadístico de los tres meses en los que fue posible medir elongación a los plásticos en los dos medios. Cabe recordar que en ambiente marino no se pudieron obtener registros de los plásticos después de 90 días de exposición.

Tabla 7.20 Valores de ANOVA unidireccional para los datos conjuntos en los dos medios de porcentaje de elongación a la ruptura.

Tiempo de exposición (días)	Grados de libertad	Valor F	Valor P
Iniciales	7	82,10	0,000
30	5	7,90	0,000
60	5	10,19	0,000
90	4	9,34	0,000

Estudio de la biodegradabilidad y ecotoxicidad de plásticos oxodegradables

Con base en la tabla 7.20, es posible concluir que el medio sí influyó en la degradación del material en cuanto son significativamente diferentes según los valores de F y P, lo cual está conforme y aclara las líneas de tendencia de la figura 7.39.

7.4 Biodegradación en ambiente controlado de laboratorio

Siguiendo los lineamientos de la norma ASTM 6691-17, titulada "Método de prueba estándar para determinar la biodegradación aeróbica de materiales plásticos en el medio marino por un consorcio microbiano definido o inóculo de agua de mar natural", se decidió realizar el ensayo con inóculo de agua marina tomada en el Puerto de Tuxpan (México). El inóculo presentó las características enlistadas en la tabla 7.21.

Tabla 7.21 Características del inóculo utilizado en pruebas de biodegradabilidad

Parámetro	Resultado
Apariencia	Cristalina
Olor	Normal
Temperatura	28 °C
Oxígeno disuelto	5,86 mg.L ⁻¹
Conductividad eléctrica	Superior a 3486 $\mu\text{S cm}^{-1}$

Como se observa en la figura 7.40, durante el primer mes de exposición la producción de dióxido de carbono fue semejante en todos los biorreactores incluyendo el reactor control positivo. Se inició la formación de dióxido de carbono después de un mes de incubación para el reactor que contiene celulosa o control positivo. Después de la semana 7 se observó aumento en la cantidad de CO₂ producido en el reactor que contenía celulosa y se empezó a formar dióxido de carbono en los reactores que contenían PEAD oxodegradable fotooxidado y sin oxidar, así como en el reactor que contiene PEAD convencional. Sin embargo, el porcentaje de mineralización en todos los casos fue inferior a 1%, siendo el más alto el correspondiente al PEAD oxodegradable fotooxidado con un valor total de 0,56%; estos resultados invalidan la prueba. La prueba es válida siempre que el valor del dióxido de carbono formado sea mayor o igual al 70% del biogás teórico para el material de referencia, en este caso no se formó la cantidad esperada.

Estudio de la biodegradabilidad y ecotoxicidad de plásticos oxodegradables

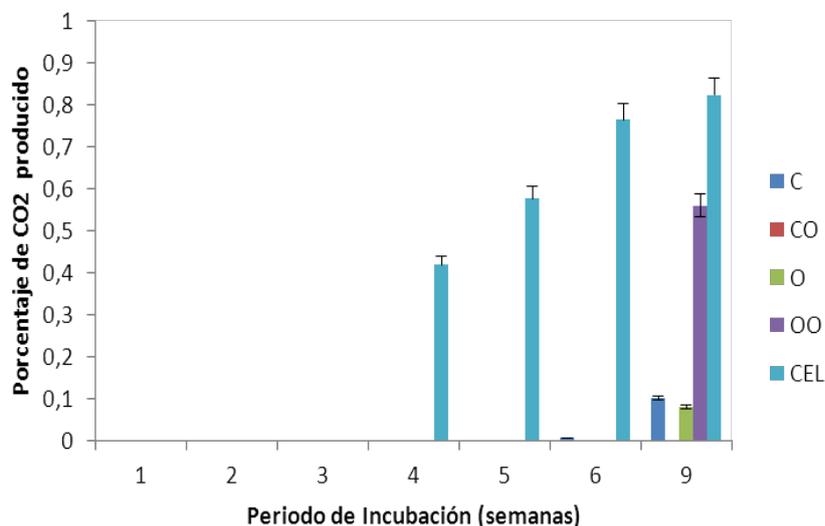


Figura 7.40 Porcentaje de producción de dióxido de carbono en condiciones controladas de laboratorio durante la prueba de biodegradabilidad de los plásticos.

En las condiciones controladas de laboratorio, la prueba no fue concluyente para diagnosticar la biodegradabilidad de los materiales, debido a que las diferencias de porcentajes de dióxido de carbono son muy próximas entre el control positivo y el control negativo, y fundamentalmente porque se observó que la celulosa (control positivo) solo se degradó el 1,0%. La exigencia de la norma para validez de la prueba es que se debe alcanzar un 70% de degradación del control positivo, lo que no ocurrió. En estas circunstancias, se hace difícil determinar si los materiales son o no biodegradables bajo las directrices de este estándar.

Para inferir cambios como consecuencia de la biodegradación, la figura 7.41 muestra las fotomicrografía de los materiales de prueba antes de someterlos al proceso de biodegradación en ambiente controlados y después de la prueba. La imagen muestra los plásticos con rugosidades propias del proceso de molienda al que se sometió previo a la prueba. El material permaneció en la disolución del inóculo marino por un periodo 60 días y no fueron notorias las diferencias encontradas como consecuencia de la exposición. Después del periodo de exposición el material se tornó humectado lo cual facilitó la toma de la micrografía, sin embargo no se encontraron diferencias pronunciadas en las películas, excepto las muestras tomadas de PEAD oxodegradable foto oxidado, que se observaron altamente fragmentadas.

Estudio de la biodegradabilidad y ecotoxicidad de plásticos oxodegradables

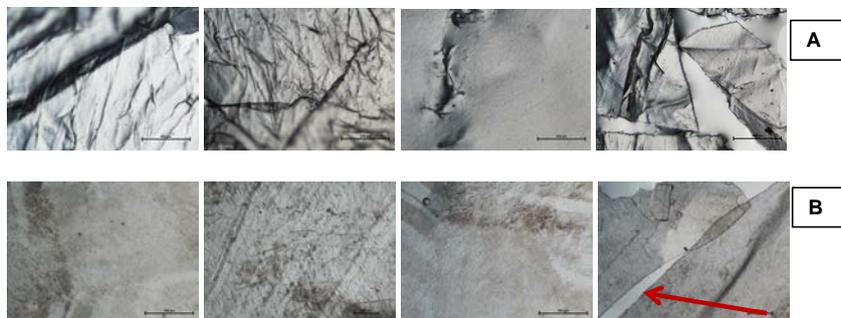


Figura 7.41 Fotomicrografía de PEAD de prueba (A): Antes de la prueba; (B): Después de la prueba. En su orden Convencional, Oxodegradable, Convencional fotooxidado, Oxodegradable fotooxidado.

7.5 Evaluación de ecotoxicidad

Existe la creencia que los plásticos, como el PEAD oxodegradable, son ecotóxicos. Teniendo en cuenta esta premisa, se planteó la evaluación del impacto de los plásticos sobre la microalga *Chlorella* sp.

7.5.1 Determinación de curva de crecimiento de la microalga *Chlorella* sp

La figura 7.42 muestra la curva de crecimiento de la *Chlorella* sp, en condiciones normales de desarrollo, microalga que se utilizó como organismo de prueba para valorar la ecotoxicidad. Debido a que el medio de cultivo utilizado tiene carácter amoniacal, el pH inicial de la solución fue de 7,5; cuando el proceso finalizó, aproximadamente a los 16 días, el valor decayó hasta valores de pH igual a 7.

Estudio de la biodegradabilidad y ecotoxicidad de plásticos oxodegradables

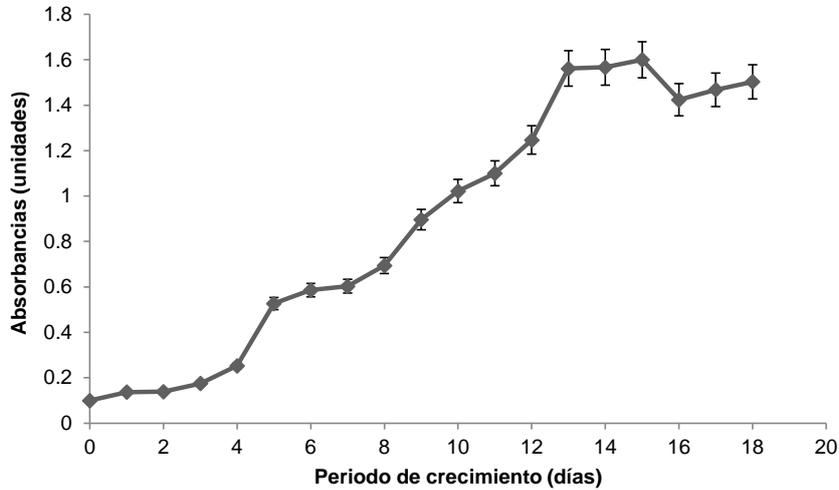


Figura 7.42 Curva de crecimiento de la *Chlorella* sp ($\lambda=647\text{nm}$).

Se obtuvo una curva clásica de crecimiento de la microalga en cultivo controlado y en volumen limitado y constante. Se observó que los dos primeros días corresponden a la fase de adaptación y que a partir del tercer día se inició la fase exponencial hasta el día 15. Los demás días registrados corresponden a la fase estacionaria. La figura 7.43 muestra colonias de *Chlorella* sp utilizada en este bioensayo.



Figura 7.43 Cultivo inicial del microorganismo de prueba, *Chlorella* sp.

7.5.2 Ensayos de toxicidad de los plásticos a diferentes concentraciones

La guía OCDE 201, recomienda el desarrollo de la obtención de la concentración letal 50 durante un periodo de 72 horas, con valores de concentración para las sustancias puras de hasta 100 mg.L⁻¹. Siguiendo estas recomendaciones no se encontró inhibición del crecimiento de la *Chlorella* sp durante ese periodo de tiempo, en presencia de los plásticos ensayados (Figura 7.44). Después de las 72 horas de seguimiento, los cultivos continuaron en observación cualitativa para determinar posibles cambios después del periodo recomendado por la guía OCDE.

Estudio de la biodegradabilidad y ecotoxicidad de plásticos oxodegradables

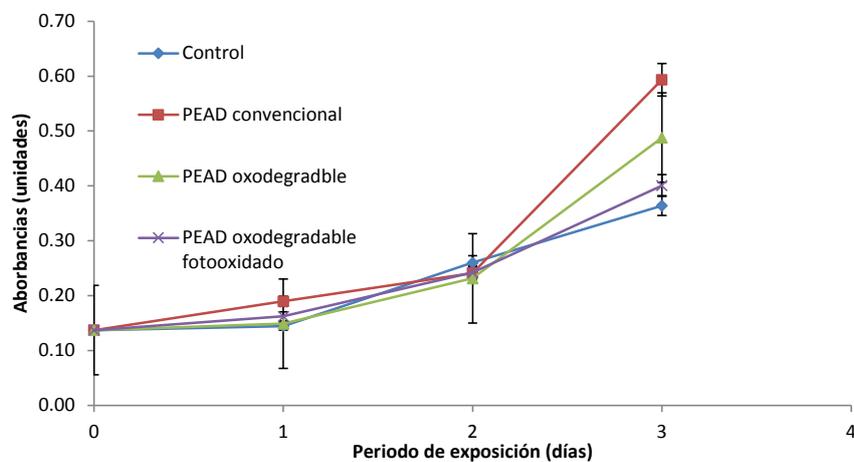


Figura 7.44 Valores de densidad óptica para el ensayo de toxicidad para concentración de plástico PEAD convencional, oxodegradable, y oxodegradable fotooxidado igual a $100,0 \text{ mg.L}^{-1}$ durante 72 h.

7.5.2.1 Ensayo con dispersión de plásticos a una concentración de $473,4 \text{ mg.L}^{-1}$ durante 96 horas

La figura 7.45 muestra las líneas de tendencia para los ensayos de ecotoxicidad con polietileno convencional, polietileno oxodegradable y polietileno oxodegradable fotooxidado a una concentración de $473,4 \text{ mg.L}^{-1}$ y para un periodo de observación de 96 horas. El valor inicial de absorbancia para todas las muestras fue de 0,100 unidades.

Estudio de la biodegradabilidad y ecotoxicidad de plásticos oxodegradables

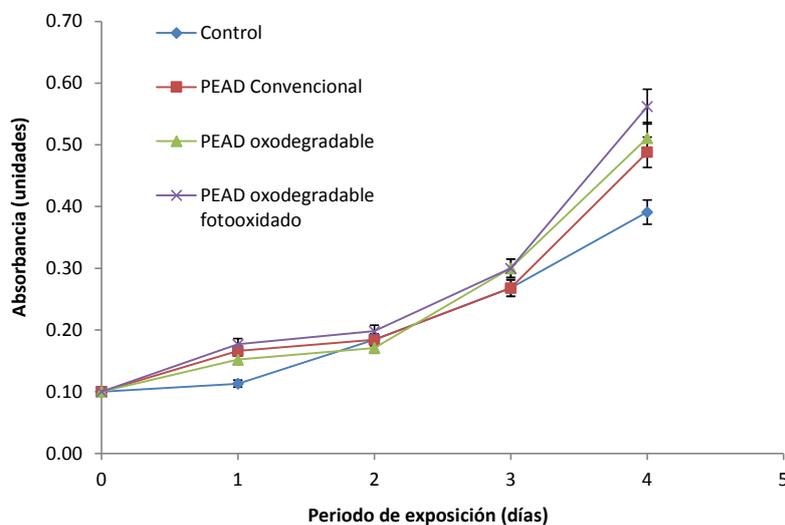


Figura 7.45 Valores de densidad óptica para el ensayo de toxicidad para concentración de plástico PEAD convencional, oxodegradable, y oxodegradable fotooxidado igual a $473,4 \text{ mg.L}^{-1}$ durante 96 h.

Para establecer las diferencias entre los ensayos, se desarrolló una prueba t de student para muestras emparejadas, comparando cada ensayo con la muestra testigo. Los resultados se muestran en la tabla 7.22.

Tabla 7.22 Estadístico t student para la concentración de plástico de $473,4 \text{ mg.L}^{-1}$.

Parámetro/Muestra	Control	PEAD	PEAD	PEAD
		oxodegradable fotooxidado	oxodegradable	convencional
Media	0,196	0,212	0,169	0,011
Varianza	0,004	0,007	0,001	0,011
Coefficiente de correlación	1,000	1,000	0,979	0,999
P(T<=t) dos colas	0,240	0,240	0,325	0,310
Valor crítico de t	4,303	4,303	4,303	4,303

Después de desarrollar las pruebas de significancia para cada una de las muestras respecto al blanco no se encontraron diferencias significativas entre ellas, este comportamiento sugiere que a dicha concentración de plástico la microalga no se ve afectada; y por tanto, los diferentes tipos de plástico no producen toxicidad a la concentración del ensayo y para el periodo de observación.

Estudio de la biodegradabilidad y ecotoxicidad de plásticos oxodegradables

Se analizó la varianza de los ensayos realizados para establecer si existen diferencias significativas entre los tratamientos. Se desea determinar la influencia de los plásticos de prueba en el crecimiento del microorganismo de prueba. Los resultados de la prueba se muestran en la tabla 7.23.

Tabla 7.23 Análisis de varianza para la concentración de plástico de 473,4 mg.L⁻¹ y periodo de exposición de 96 horas.

Origen de las variaciones	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Promedio de cuadrados	F	Probabilidad	Valor crítico F
Entre grupos	0,005	3,000	0,002	0,303	0,823	4,066
Dentro de los grupos	0,046	8,000	0,006			
Total	0,051	11,000				

De la tabla 7.23, se deduce que no hay diferencia significativa entre el grupo de ensayos. Así se confirma que los biorreactores que contienen los plásticos se comportan de la misma manera que el biorreactor control o testigo y se concluye que la microalga sigue la cinética normal de crecimiento. La figura 7.46 corresponde al registro microfotográfico de la *Chlorella* sp después del ensayo de toxicidad.

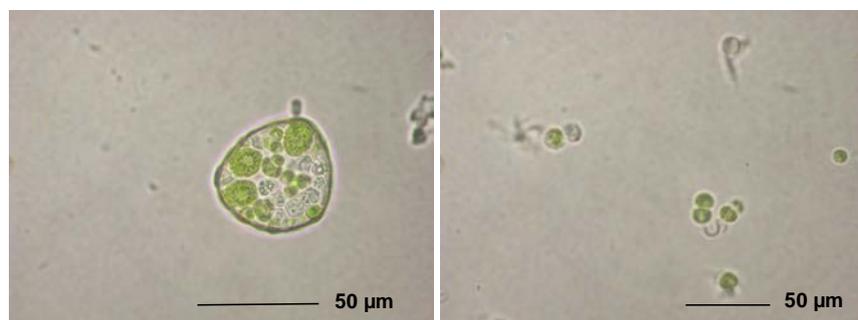


Figura 7.46 Colonias de *Chlorella* sp después del periodo de observación de 96 horas en las suspensiones de 473,4 mg. L⁻¹ de los plásticos de prueba.

No se observan cambios morfológicos para este nivel de observación (50 µm), se infiere que el microorganismo continúa en su fase exponencial sin alteración, con esto se quiere significar que la presencia de los plásticos de prueba no alteró su ciclo de crecimiento.

Con estos antecedentes se examinó el comportamiento de la *Chlorella* sp cuando la concentración del agente estresor (plásticos) fue incrementada hasta en un 250%, a lo cual se le llamó concentración elevada, concentraciones de plásticos que probablemente no son frecuentes en la naturaleza. El siguiente apartado muestra los resultados para esta situación hipotética.

Estudio de la biodegradabilidad y ecotoxicidad de plásticos oxodegradables

7.5.2.2 Ensayo para concentración elevada de plásticos durante el periodo de 96 horas

La figura 7.47, muestra las curvas de crecimiento de la *Chlorella* sp, sin factor de estrés y en una dispersión de 1,0000 g.L⁻¹ de los plásticos PEAD, PEAD oxodegradable, PEAD oxodegradable fotooxidado como factor de estrés.

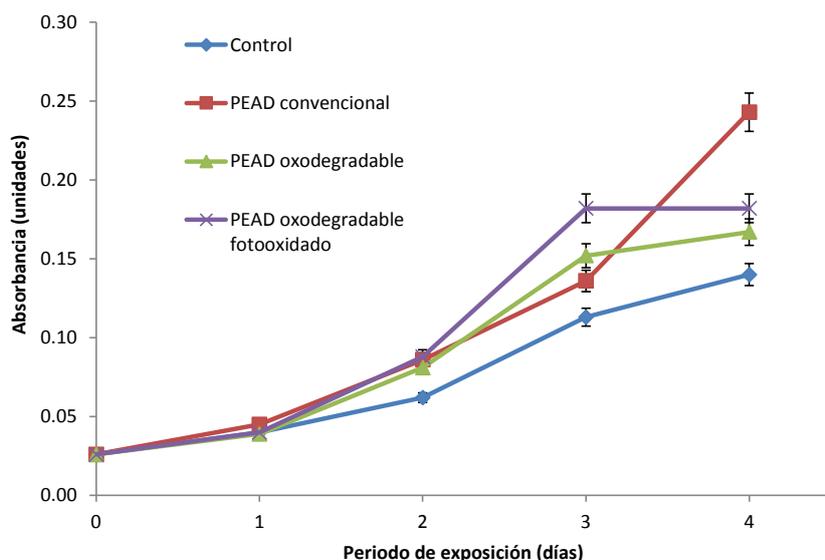


Figura 7.47 Curvas de crecimiento para un periodo de 96 horas de *Chlorella* sp en cultivo control y en una dispersión de los plásticos PEAD convencional, oxodegradable, y oxodegradable fotooxidado en concentración de 1,0000 g.L⁻¹.

El resultado muestra que la microalga sigue su proceso normal de desarrollo, en presencia de los plásticos estudiados. Por tanto, bajo las condiciones de la concentración del experimento no se considera un agente generador de ecotoxicidad, para el periodo de observación, de 72 horas que es lo recomendado por la guía OCDE 201.

Para el PEAD oxodegradable fotooxidado se observó que la línea de tendencia entre las 48 horas y las 72 horas de exposición es plana (no cambio de pendiente), lo cual permitió inferir que se alcanzó la fase estacionaria del crecimiento cuando se compara con la curva normal esperada (Figura 7.42) y también con respecto a lo mostrado en los demás biorreactores; en consecuencia se consideró que el proceso de crecimiento se desacelera y por tanto, el factor de estrés podría haber afectado el desarrollo normal de la microalga. El análisis estadístico contribuyó a establecer si el comportamiento del biorreactor en cuestión continúa con dicha tendencia o se trata de un dato anómalo. Además, aparentemente el cultivo del PEAD convencional creció más rápidamente que los demás tratamientos; sin embargo, aplicando t de student, para dos muestras emparejadas, se pudo establecer que no hubo diferencias

Estudio de la biodegradabilidad y ecotoxicidad de plásticos oxodegradables

significativas en el comportamiento de la micro-alga en las diferentes dispersiones, como se aprecia en la tabla 7.24.

Tabla 7.24 Valores de t, para los tratamientos PEAD convencional, oxodegradable, y oxodegradable fotooxidado, comparados con muestra control en 1,0000 g.L⁻¹.

Valores de t	Muestras emparejadas
0,1287	Control vs PEAD convencional
0,0961	Control vs PEAD oxodegradable
0,9679	Control vs PEAD oxodegradable fotooxidado

A partir de este comportamiento se puede inferir que los materiales o sus productos de degradación no son tóxicos para la microalga. Se sabe que el aditivo prodegradante d2w® contiene estearato de manganeso; en caso de liberarse al medio puede esperarse que no produzca daño celular pues es un micronutriente que debe estar presente en el medio de crecimiento de la microalga, sin embargo esto no significa que el metal no pueda afectar el ecosistema en condiciones naturales dado que el ingreso de materiales a los ecosistema continúa creciendo y por tanto las concentraciones de sustancias derivadas de ellos se acumularán.

Considerando los resultados estadísticos anteriores se puede concluir que no hubo una afectación en los valores de crecimiento del microorganismo durante el periodo de observación recomendado por la norma. El siguiente punto trata de establecer si existe un punto de quiebre en el cual el microorganismo no soporte el estrés provocado por los materiales de prueba que pueda afectar su ciclo normal. Bajo esta consideración se tomó la decisión de evaluar el comportamiento durante todo su ciclo de vida, el cual es de 16 días en promedio.

7.5.2.3 Ensayo para concentración elevada de plásticos (1.0000 g.L⁻¹) durante periodo normal de crecimiento de 16 días

La figura 7.48 muestra el ciclo típico de crecimiento de *Chlorella* sp en cultivo control y en presencia de los diferentes tipos de plásticos en concentración de 1,0000 g.L⁻¹.

Estudio de la biodegradabilidad y ecotoxicidad de plásticos oxodegradables

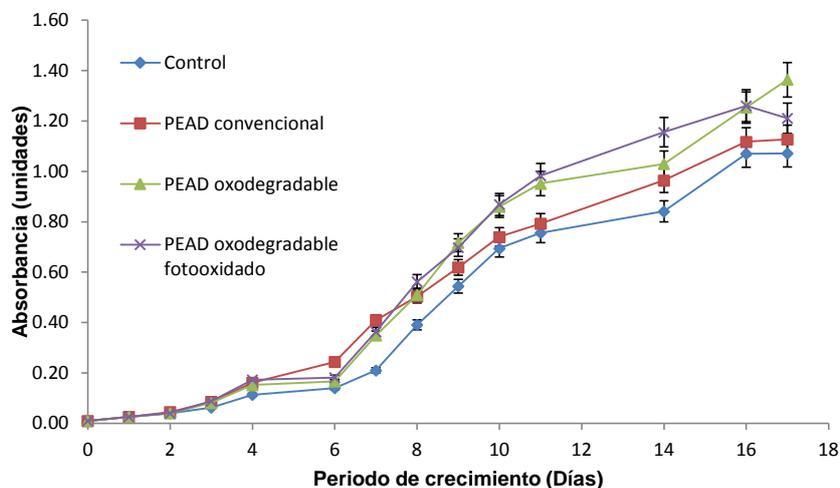


Figura 7.48 Curvas de ciclo típico de crecimiento en cultivo control de *Chlorella* sp y en presencia de los diferentes tipos de plásticos en concentración de 1,0000 g.L⁻¹.

En las figuras 7.47 y 7.48, se logra identificar que el biorreactor para la muestra control alcanza los valores promedio con el menor crecimiento de la biomasa. Los demás biorreactores no exhiben una tendencia particular.

En el Anexo A8, se muestran las estadísticas para los valores de la concentración de biomasa expresada como densidad óptica para cada réplica en cada tratamiento con una concentración de dispersión de cada plástico de 1000 mgL⁻¹ (anexo A8-1); así mismo las tablas del anexo A8 (Tabla A8-1 a A8-5) muestra la prueba de Tukey para cada tratamiento y así establecer si existen diferencias entre réplicas y entre tratamientos. Se encontró que en ningún caso las réplicas de los tratamientos experimentales presentaron diferencias estadísticamente significativas. Una vez se verificó la reproducibilidad y repetitividad de los tratamientos mediante el análisis ANOVA y comparaciones de Tukey, se decidió realizar un cálculo promedio que fuese el valor representativo característico de los valores del crecimiento diario de la biomasa por tratamiento (Anexo A8-2).

Con datos promedios normales (Anexo 9), se desarrolló ANOVA (Tabla 7.25) para establecer si existen diferencias significativas entre los tratamientos.

Tabla 7.25 ANOVA para prueba de toxicidad de los plásticos (concentración de 1,0000 g.L⁻¹).

Grados de Libertad	Estadístico F	P valor
3	0,23	0,874

Estudio de la biodegradabilidad y ecotoxicidad de plásticos oxodegradables

Como se muestra en la tabla 7.25, el estadístico F, permite afirmar que no existe diferencia significativa en el crecimiento de la biomasa; y por ende, se descarta la hipótesis de que los plásticos a las concentraciones del ensayo, son materiales tóxicos para la microalga *Chlorella* sp. En la figura 7.49 se muestra la caja de valores para el crecimiento promedio de biomasa diario para cada tratamiento. Se observa que la presencia de PEAD oxodegradable y convencional con y sin fotooxidación previa no alteran el ciclo de vida de la microalga *Chlorella* sp.

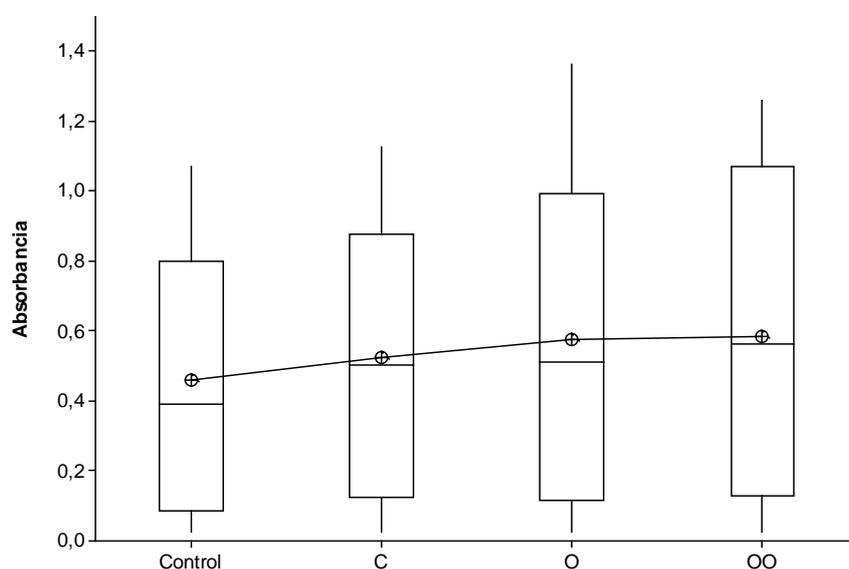


Figura 7.49 Caja de valores para el crecimiento promedio diario de biomasa para el PEAD: C, convencional; O, oxodegradable; OO, oxodegradable fotooxidado ($1,0000 \text{ g.L}^{-1}$).

7.5.3 Micrografías de las colonias de *Chlorella* sp durante su ciclo de vida.

Prosiguiendo el análisis del organismo de prueba, en esta sesión se mostrarán evidencias fotográficas que se corresponden con los hallazgos de las secciones anteriores.

En las figuras 7.50-7.52 se muestran algunas colonias encontradas en la solución después de un periodo de observación de 16 días, tiempo durante el cual sólo se adicionó agua estéril a todos los biorreactores. Ésta es una condición de estrés que permite evaluar si bajo estas circunstancias los microorganismos sobreviven. La imagen de la figura 7.50 muestra comparativamente el microorganismo del cultivo control (en ausencia de plásticos) con periodo

Estudio de la biodegradabilidad y ecotoxicidad de plásticos oxodegradables

de exposición de 72 horas (tiempo de observación según la norma) y su ciclo de crecimiento normal (16 días).

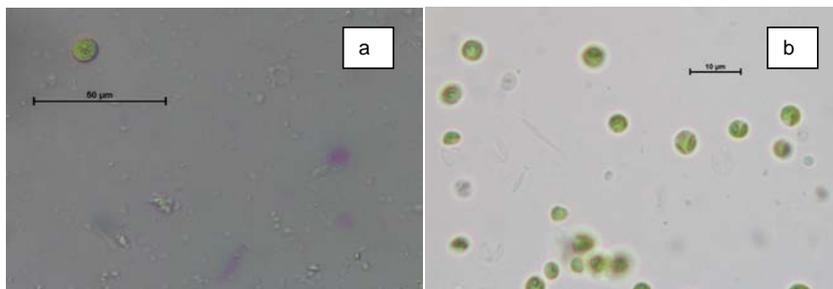


Figura 7.50 *Chlorella* sp sin adición de nutrientes: (a) Cultivo control a 72 horas;(b) 16 días de crecimiento.

Como se observa en la imagen b de la figura 7.50, aún la micro-alga está presente y logró aumentar el número de colonias, no se encontraron alteraciones respecto al ciclo normal de crecimiento.

La figura 7.51, corresponde a una muestra del microorganismo en la dispersión de $473,4 \text{ mg.L}^{-1}$ PEAD oxodegradable en diferentes tiempos de exposición (72 horas y 16 días, respectivamente), se observó que su apariencia fue semejante al cultivo control. Como antes se mencionó, la morfología y el ciclo de vida, no se vieron afectados por la presencia del PEAD oxodegradable. Todos los plásticos ensayados exhiben el mismo comportamiento.

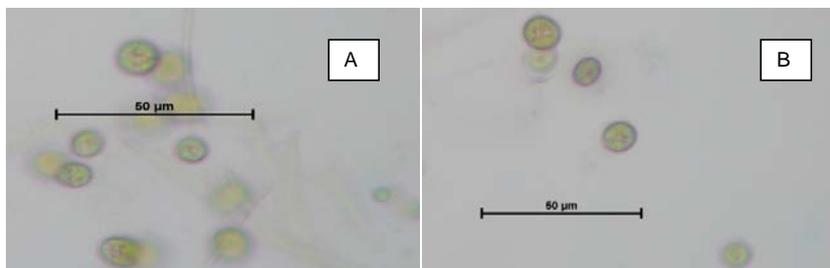


Figura 7.51 Comparativo morfológico de la exposición de *Chlorella* sp en una dispersión $473,4 \text{ mg.L}^{-1}$ de PEAD oxodegradable: (A) En las primeras 72 horas; (B) Después de 16 días.

Fotomicrografías del microorganismo para un periodo de observación superior a su fase estacionaria.

Con el objeto de observar el comportamiento de la microalga frente a los plásticos de estudio, en un periodo superior a su ciclo normal de crecimiento se observó por un periodo de 60 días después de iniciado el proceso, tiempo durante el cual no se adicionaron nutrientes y se mantuvo constante el nivel de agua. En estas condiciones la microalga fue incapaz de crecer.

Estudio de la biodegradabilidad y ecotoxicidad de plásticos oxodegradables

La muerte de la microalga, se evidenció por el cese de la fotosíntesis, es decir, cuando el valor de la absorbancia disminuyó. Ello es corroborado con las fotografías de la figura 7.52.

La figura 7.52 corresponde a una muestra del microorganismo en la dispersión de 473,4 mg.L⁻¹ PEAD oxodegradable en diferentes tiempos de exposición (72 horas y 16 días, respectivamente), se observó que su apariencia fue semejante al cultivo control. Como antes se mencionó, la morfología y el ciclo de vida, no se vieron afectados por la presencia del PEAD oxodegradable. Todos los plásticos ensayados exhiben el mismo comportamiento.

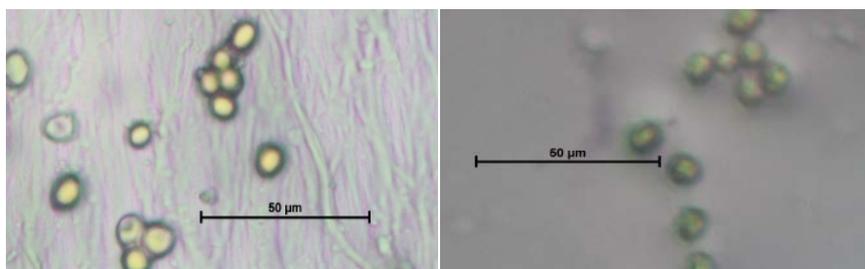


Figura 7.52 *Chlorella* sp, expuesta durante 60 días en una dispersión de 473,4 mg.L⁻¹ de PEAD convencional.

La pigmentación del plástico no ha sido considerado como una variable de interés en esta investigación. Sin embargo se observó que las zonas pigmentadas son indiferentes para el microorganismo *Chlorella* sp, se determinó que durante largo periodos de exposición, todos los biorreactores tienen el mismo comportamiento; a manera de ejemplo se presenta la microfotografía de una muestra proveniente de los reactores de PEAD convencional (Figura 7.53).

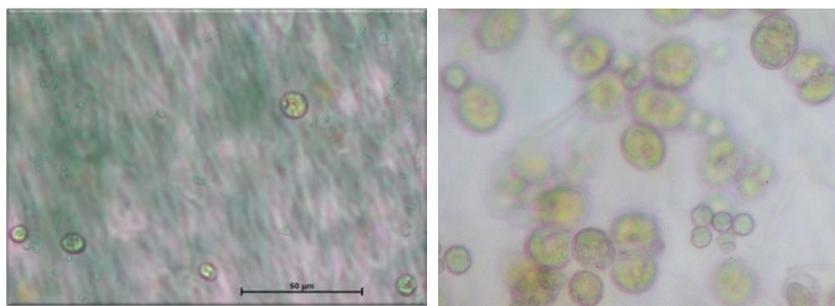


Figura 7.53 Colonias vivas de *Chlorella* sp, después de 60 días de exposición, en una dispersión de 473,4 mg.L⁻¹ de PEAD convencional.

Razonablemente se puede afirmar que no existió inhibición del crecimiento de la *Chlorella* sp, para los periodos de observación recomendadas por la guía OCDE 201. La microalga se desarrolló de manera normal siguiendo el patrón del reactor control. No se registró evidencia de afectación al microorganismo en caso de la generación de lixiviados provenientes de los

Estudio de la biodegradabilidad y ecotoxicidad de plásticos oxodegradables

plásticos. Se observó que el microorganismo aparece en ocasiones como un depósito sobre los plásticos de prueba, sin embargo se constató que no está adherido a la superficie del plástico. Una vez finalizada la prueba, los plásticos fueron observados al microscopio y no se encontraron evidencias de alteración de su superficie.

Como se mencionó, de acuerdo/ con las guías de toxicidad OCDE, no se encontró inhibición de crecimiento de la microalga para los periodos de exposición propuestos. Los cultivos observados mostraron que aun después de un largo período de exposición (60 días), grupos de colonias de dicho microorganismo permanecieron en la dispersión acuosa y algunas sobre los plásticos, lo cual permite inferir que la *Chlorella* sp resistió las condiciones drásticas de ausencia de nutrientes y que el factor de estrés no causó toxicidad. Por otra parte, si se desea conocer detalles más precisos sobre posibles daños que pudiera haber sufrido el microorganismo a nivel celular o nivel de organelos será necesario ejecutar análisis utilizando técnicas de biología molecular y verificar posibles mutaciones ocurridas o cambios morfológicos profundos a través de técnicas más sofisticadas.

Además, se observó que después de un periodo muy grande de exposición (60 días) desaparece la coloración verde (atribuida a la clorofila) en todas las muestras procesadas incluyendo el control. Los cambios en la estructura celular pueden mostrarse de mejor forma con técnicas tales como SEM; hecho que ha sido mostrado por algunos investigadores (Passos *et al.*, 2014). Las diferencias morfológicas aparentes encontradas muestran que el tamaño aumentaría, pues se asume que están más cerca mejorando la cohesión intercelular y la aglomeración (Danquah *et al.*, 2009).

Capítulo VIII

DISCUSIÓN

8 DISCUSIÓN

La degradación de polietileno ha sido un tema recurrente desde la visión de su uso y de su mineralización, aspectos que deben converger. Particularmente, el polietileno con aditivo oxodegradable ha sido propuesto para que una vez cumplido su etapa de uso, se mineralice.

Este estudio muestra comparativamente el comportamiento de PEAD convencional y oxodegradable, en sistemas acuosos bajo condiciones controladas de laboratorio y en escenarios naturales de agua dulce (río) y agua salada (mar). A continuación se discutirán cada uno de los resultados obtenidos.

8.1 Materiales iniciales

El PEAD es un material polimérico de alto peso molecular, de carácter hidrófobo y en consecuencia de difícil asimilación por el metabolismo microbiano y no se ha demostrado hasta este momento que cumpla la función de fuente de carbono de especie alguna. Al igual que la mayoría de los plásticos, tiende a absorber radiación de alta energía en la porción UV del espectro activando sus electrones a una mayor reactividad, causando oxidación, y por tanto degradación. Investigadores han demostrado que la degradación de plásticos está determinada por la estructura química y las propiedades físicas y no por el origen natural o sintético, y se ha informado que la velocidad de degradación depende del tipo de polímero, de la cantidad de aditivos y de la temperatura (Eubeler *et al.*, 2010; Jakubowicz, 2003); por tanto, se esperaría que los materiales ensayados se degraden una vez estén expuestos en condiciones ambientales naturales.

Los materiales originales mostraron propiedades físicas (mecánicas) y químicas semejantes. La variabilidad obtenida en la elongación a la ruptura se atribuye a la naturaleza de los procesos productivos de los plásticos, en los cuales es imposible garantizar que todas las moléculas tengan el mismo grado de polimerización y por tanto la masa relativa de cada cadena polimérica puede variar, así que se prefiere hablar de distribución de masas moleculares. Otro factor que incide en la variabilidad, es el postproceso productivo, en el cual el material es sometido a diferentes tensiones y cambios de temperatura que consecuentemente producen variaciones de las propiedades. Además, son materiales cuyo destino es servir de empaque para supermercado, en el cual la no uniformidad de las masas moleculares no determina en gran medida el desempeño.

En las figuras 7.1 y 7.2, se mostró el gráfico de distribución de probabilidad para el porcentaje de elongación a la ruptura de las probetas de PEAD convencional y oxodegradable originales y de ella se puede inferir que el hecho de agregar un aditivo prooxidante al material en las concentraciones recomendadas por los fabricantes del aditivo, no ocasiona alteración a las propiedades mecánicas del PEAD. Se encontró que la dispersión de los valores de porcentaje de elongación tiene distribución normal.

Estudio de la biodegradabilidad y ecotoxicidad de plásticos oxodegradables

Desde el punto de vista químico, los espectros FTIR mostraron que los materiales exhiben cuatro absorciones típicas a 2910, 2849, 1475 y 730 cm^{-1} (Figuras 7.16 y 7.32), con intensidad semejante, lo que implica que son esencialmente cadenas poliméricas sin grupos funcionales oxidados, lo que permite inferir que el contenido del agente prodegradante en el plástico oxodegradable no altera la estructura química (Tabla 7.4) y por tanto no está unido químicamente a la cadena del polímero.

En el análisis químico de metales, se encontró que la única diferencia importante entre los materiales objeto de estudio, es el contenido de aditivo prodegradante en el PEAD oxodegradable, que en este caso es un compuesto basado principalmente en manganeso.

8.2 Fotooxidación previa

El envejecimiento foto químico (también llamado fototérmico), por lo general, se presenta por la interacción de fotones de alta energía con la matriz polimérica y esta interacción se produce por difusión o por reacción química, influenciada por variables como la temperatura y la concentración de oxígeno. La oxidación previa o degradación abiótica desarrollada en cámara de intemperismo, permitió simular el envejecimiento o daño que sufren los materiales en el medio ambiente natural para hacer posible estudiar la relación existente entre los cambios del material y las condiciones de envejecimiento ensayadas.

El envejecimiento acelerado da lugar a alteraciones de las moléculas de los polímeros y por tanto produce cambios en las propiedades del material. Esta variación se registró en términos de disminución del porcentaje de elongación a la ruptura (proceso irreversible), en función del tiempo de exposición, y se observó una disminución paulatina. Se considera que el decaimiento de esta propiedad es una consecuencia de cambios estructurales a nivel microscópico debidos a procesos químicos de oxidación, que generan ruptura de las cadenas poliméricas e inducen la degradación abiótica del material, lo cual concuerda con hallazgos reportados por otros investigadores (Ammala *et al.*, 2011).

La elongación a la ruptura es una medida indirecta de la reducción del peso molecular, que aumenta la movilidad de la cadena de polímero dando lugar a un mayor grado de cristalinidad y pérdida de ductilidad (Jabarin y Lofgren, 1994); esto está conforme con lo encontrado en las probetas inicialmente foto oxidadas del PEAD oxodegradable y posteriormente con lo exhibido por las probetas de PEAD oxodegradable sin fotooxidación previa, que se fragiliza más rápidamente que el convencional. Además, de acuerdo con lo expresado por Koutny *et al.*, (2006), macroscópicamente la oxidación de los plásticos se manifiesta como una pérdida de las propiedades mecánicas y fragmentación de la película, evidencias encontradas en muestras analizadas en este trabajo. Se puede inferir que el mecanismo de reacción está fuertemente influenciado por la radiación solar, como se ilustra en la figura 8.1.

Estudio de la biodegradabilidad y ecotoxicidad de plásticos oxodegradables

Figura 8.1 Mecanismo propuesto para la degradación plásticos. Fuente: Chandra y Rustgi, 1998.

El mecanismo propuesto supone, inicialmente, el rompimiento de un enlace C-H de la cadena del polímero para producir un radical hidrocarbonado, el cual en presencia de oxígeno por la acción de la luz o de fotones de energía, produce un nuevo radical peroxidado y por tanto inestable, que logra estabilizarse formando un nuevo enlace carbonilo propio de cetonas, aldehídos y ácidos; este mecanismo es general y explica la oxidación de cualquier plástico. Dicha ruptura es debida a la capacidad de los plásticos para absorber radiaciones de un amplio rango del espectro electromagnético: radiación de alta energía UV B (295-315 nm), UVA (315-410 nm), radiación de la región visible (420-760 nm) y radiaciones de menor energía en forma de calor (región del IR). En el caso de la presencia de metales prooxidantes, tales como hierro, cobalto y manganeso, el mecanismo que está descrito en la figura 5.4, explica cómo el metal actúa iniciando el proceso de oxidación (Ammala *et al.*, 2011).

El PEAD oxodegradable fue mucho más sensible al proceso de fotooxidación, encontrando que para tiempos iguales de exposición en la cámara de intemperismo siempre el porcentaje de elongación fue más bajo. Se considera que el factor diferenciador fue la presencia de

Estudio de la biodegradabilidad y ecotoxicidad de plásticos oxodegradables

manganeso (aditivo prodegradante), el cual promueve la degradación, mediante la descomposición de hidroperóxidos formados en el proceso de obtención de las películas (Portillo *et al.*, 2016). Esto concuerda con los hallazgos de (Roy *et al.*, 2009), quien demostró que el manganeso es un metal que promueve la fotooxidación y la termooxidación.

La pérdida paulatina de las propiedades mecánicas fue observada en todas las probetas incluyendo las del material PEAD convencional, en la medida que el tiempo de exposición aumentó hasta pérdida completa. El resultado se traduce en un material fragmentado, particularmente el caso de PEAD oxodegradable (con aditivo prooxidante), se encontró que los fragmentos disminuyen su tamaño, en ocasiones hasta pulverización, resultado que coincide con lo encontrado por otros investigadores (Corti *et al.*, 2010b; Fontanella *et al.*, 2013; Koutny *et al.*, 2008; Koutny *et al.*, 2006).

Por otra parte, el parámetro activador de la fotooxidación es la radiación de alta energía (UV) y puede presentarse en ausencia de oxígeno y de calor (Shah *et al.*, 2008), sin embargo, tanto en las condiciones de laboratorio como en condiciones naturales el oxígeno estuvo presente, lo cual facilita la oxidación del material.

Tras largos periodos de fotooxidación de los materiales en cámara de intemperismo, se encontró que el material se fragmenta, en ocasiones el tamaño de las partículas es inferior a 5 mm. Independientemente, de la utilización o no de agente prodegradable, cuando los plásticos han sido extensamente expuestos en condiciones de radiación solar, perderán las propiedades mecánicas y presentarán fragmentación con cinéticas diferentes. En general, se considera que las transformaciones del polímero se producen en forma directa por excitaciones de los enlaces carbono-carbono y enlaces carbono-hidrógeno, consecuentemente pueden producirse entrecruzamientos o bien fotodegradación, o los dos fenómenos simultáneamente, ocasionando cambios en la cristalinidad del material; en forma indirecta, por la creación de especies altamente oxidantes (oxígeno atómico, radicales de oxígeno) los cuales atacan directamente la cadena polimérica oxidando las capas superiores del polímero como ha sido reseñado en trabajos anteriores (Øiseth *et al.*, 2004).

La evidencia es el decaimiento de la elongación a la ruptura, amarillamiento, cambios en la transparencia ya discutidos y que está conforme con los mecanismos de Norrish I y II. En este caso, el proceso de fotooxidación acelerado en laboratorio en la cámara de intemperismo, confiere la activación del mecanismo de formación de radicales libres, que a su vez incrementa el rompimiento de la cadena polimérica generando moléculas con mayor cantidad de grupos oxidados. Por desgracia, no significa que el material se degrade completamente hasta mineralización en este periodo de tiempo, solo se observó que se convirtió en materiales, en el caso del PEAD oxodegradable, con tamaños inferiores a 5 mm, denominados microplásticos (GESAMP, s.f.). Esta conversión de macrolásticos a microplásticos, da inicio una nueva fase en el proceso de contaminación, que afecta el medio y existen evidencias marcadas del daño potencial que causa sobre el ecosistema global (Wright *et al.*, 2013). En este mismo sentido se

Estudio de la biodegradabilidad y ecotoxicidad de plásticos oxodegradables

ha encontrado que el PE es susceptible a la oxidación como consecuencia de procesos de carácter mecánico, se producen fracturas y hendiduras cuando ellos están presentes en los sedimentos, y cuando están en la columna de agua el proceso oxidativo es más de carácter químico. Es necesario recalcar que la reducción de tamaño a pocos centímetros, solo resulta en partículas microscópicas que permanecerán en forma aún no definida en el ambiente (Cooper, 2010), como se discutió previamente.

Lo que aún no se conoce es cuál es el destino final de estos fragmentos o microplásticos y cuál es el tiempo necesario para su desintegración y mineralización completa, o cuáles son las implicaciones en los ciclos naturales. El estudio de la cinética de la degradación biótica y abiótica de los materiales en el ambiente es aún una tarea pendiente.

8.3 Degradación en ambientes naturales, observación visual

La degradación de los plásticos en ambientes acuáticos se genera en virtud de su naturaleza hidrófoba y de largos tiempos de permanencia en el agua o en los sedimentos, que promueve la colonización microbiana y la formación de biopelícula, como fue observado en todas las probetas expuestas en los dos medios, aseveración que coincide con los hallazgos de otros investigadores (Zettler *et al.*, 2013).

El término biopelícula se aplica a microorganismos incrustados en una matriz de polímero, que se adjunta a las superficies de todo tipo, y en general se dice que todo tipo de superficie polimérica puede ser dañada por la biopelícula a través de la cobertura de su superficie (Flemming, 1998).

Todas las probetas expuestas de PEAD convencional y oxodegradable, con y sin fotooxidación previa, después de ser expuestas durante 180 días en ambientes acuáticos naturales mar y río, sufrieron formación de biopelícula. Se encontró que todas las películas expuestas, incrementaron la cantidad de biopelícula con el tiempo de exposición y el incremento fue independiente de las condiciones climáticas, bastante estables durante el año dado que el lugar de exposición es una región tropical. Las muestras expuestas en el mar presentaron mayor cobertura de biopelícula como lo evidencian los resultados de las figuras 7.5 a 7.8. Además, en ambiente marino, todas las muestras de los plásticos fueron colonizadas por macro y microorganismos marinos.

Los depósitos sólidos de diferente naturaleza (orgánicos e inorgánicos), son capaces de gestar las condiciones apropiadas para el desarrollo de organismos y hábitats adecuados para invertebrados y microorganismos, como fue reseñado en las imágenes de las figuras 7.5-7.8 para probetas expuestas en el mar y las figuras 7.23-7.26 para las probetas expuestas en el río. En la figura 7.15 se mostró la biopelícula ampliada a 100 micras, se logra establecer la presencia de diferentes depósitos de materiales. Las figuras 7.18 y 7.38, ejemplifican el depósito de "suciedad" y algunas especies de invertebrados, lo que permite inferir que los

Estudio de la biodegradabilidad y ecotoxicidad de plásticos oxodegradables

plásticos sufren estrés mecánico, químico y enzimático en razón del metabolismo de los organismos presentes en todas las probetas. Estos hechos han sido reseñados en otras investigaciones (Gu, 2003; Zettler *et al.*, 2013), que afirman que los miembros de la comunidad de la “plastifera” (término acuñado recientemente) hidrolizan a los plásticos y podrían contribuir a la degradación física.

La degradación observada para todas las probetas expuestas en los dos ambientes, en la mayoría de los casos puede considerarse como biodeterioro, afirmación derivada del hecho de que fue posible recuperar las probetas o partes de ellas.

¿Quiénes producen deterioro? En el caso de los materiales expuestos en ambiente marino natural se observó la colonización paulatina de crustáceos, algas y otros organismos en todas las probetas, que se convirtieron en un nuevo hábitat para diferentes especies. Los organismos presentes segregan diferentes sustancias como resultado de su metabolismo y permiten que haya adherencia de estos al material a través de fuerzas de atracción a nivel molecular. De acuerdo con lo discutido por otros (Artham *et al.*, 2009; Keswani *et al.*, 2016; Muthukumar *et al.*, 2011; Sudhakar *et al.*, 2008; Zettler *et al.*, 2013), la segregación de sustancias por parte de los organismos presentes en la superficie de las probetas permite que las fuerzas que unen la biopelícula al plástico sean de mayor intensidad; podrían estar presentes fuerzas tales como puentes de hidrógeno, interacciones metal-ligando, fuerzas de carácter electrostático fuerte como quelación con cationes presentes en la matriz del polímero para formar complejos (Muthukumar *et al.*, 2014). Prueba de las fuerzas de atracción es la dificultad de remoción de la biopelícula en las probetas del mar, se puede explicar este comportamiento teniendo en cuenta que en los primeros días de exposición la radiación y los demás factores de envejecimiento natural no han afectado el material en cuanto los antioxidantes y demás aditivos aún están presentes. Las mediciones de los “pegamentos” de la biopelícula sobre el polímero se convierten en una tarea a desarrollar con el objeto de probar la intervención biológica en el deterioro de los materiales, tal como los reportados por la biodegradación poliésteres y otros polímeros (Eubeler *et al.*, 2010; Kawai, 2010).

Impurezas (limo, arcillas, detritus) permanecen unidas a la columna del material produciendo erosión y como se observó, se produjeron cambios muy notorios en la apariencia física del material. La biopelícula, genera un microambiente que determina las condiciones de vida de los microorganismos, parece ser un sistema muy sofisticado (Figura 7.38 A), que permite la vida de microorganismos y provoca que la superficie se torne áspera y opaca en la mayoría de los casos; se puede inferir que los cambios generan afectación de la porosidad, la densidad, el contenido de agua, estabilidad mecánica, propiedades de sorción y la carga del polímero, tal como ha sido también reseñado por otros investigadores (Keswani *et al.*, 2016).

Para mejorar el entendimiento de la forma como la biopelícula afectó al material, se necesitan mejores técnicas analíticas como la marcación isotópica, ellas podrían ser funcionales a la hora de comprobar que átomos de carbono pertenecientes a la molécula polimérica se han

Estudio de la biodegradabilidad y ecotoxicidad de plásticos oxodegradables

incorporado a las macromoléculas (ADN, polisacáridos) de los microorganismos (Restrepo-Florez *et al.*, 2014) y así evidenciar si algunos de estos microorganismos son potenciales degradadores de los plásticos.

Por otra parte, la opacidad o pérdida de transparencia de las probetas después de ser limpiadas, se traduce como la consecuencia de cambios a nivel del micro-estructura, la que a su vez depende de cambios a nivel molecular. Algunos investigadores sugieren que el mecanismo de deterioro de los materiales poliméricos es debido a la disponibilidad de fuente de carbono a partir del plástico tales como aditivos, plastificantes, colorantes y otras impurezas presentes en ellos (Gu, 2007). Particularmente, para el caso de PEAD oxodegradable fotooxidado, podría esperarse que los cambios moleculares hayan provocado liberación de moléculas pequeñas, atrayendo microorganismos afines, como algunos hongos y bacterias, a los que se les atribuye capacidad degradadora. Esto no fue corroborado en la presente investigación, pues los microorganismos encontrados fueron semejantes en las probetas analizadas. Sin embargo, se ha demostrado mediante estudios quimioluminiscencia que los plásticos con aditivos prodegradantes generan cantidades significativas de productos de degradación de la matriz polimérica, en la cual los hidroperóxidos formados son descompuestos por los metales de transición utilizados como prodegradante (Pablos *et al.*, 2010), lo que permite inferir que estos productos podrían ser utilizados por los microbios como fuente de carbono.

8.4 Degradación en ambiente naturales, influencia de las características del medio

La radiación solar fue un factor común en los dos medios. En los primeros 30 días de exposición la cantidad de biopelícula fue muy baja, por lo que las probetas reciben la radiación directa del sol, en tanto que en los meses subsiguientes se observó que hay mayor cantidad de biopelícula en las muestras de ambiente marino. Del mismo modo, factores abióticos como salinidad, pH, temperatura, presión, son determinantes en la tasa y en el grado de degradación porque influyen la cantidad de biopelícula formada, como ha sido reportado en otras investigaciones (Azis *et al.*, 2001); en consecuencia, en términos de la influencia de microbios, la degradación de los plásticos fue diferente en las probetas expuestas en los dos ambientes naturales. Las características que definen la calidad del agua en cada uno de los medios (salinidad, pH, calcio, alcalinidad, entre otros), fueron marcadamente diferentes. El agua marina exhibe los mayores valores en dichos parámetros y se encontró que los materiales sufrieron mayor deterioro (fragmentación, agujeros) en condiciones naturales de agua marina, lo cual permite inferir que las características del agua influyeron en la degradación.

La salinidad fue uno de los parámetros diferenciadores entre el agua de mar y el agua dulce, su influencia fue notoria en el desarrollo de las especies que se encontraron en uno y en otro ambiente, como lo fue también la apariencia de las probetas expuestas; por tanto la

Estudio de la biodegradabilidad y ecotoxicidad de plásticos oxodegradables

degradabilidad en términos generales fue dependiente de factores químicos y ambientales, aseveración que está conforme con lo expresado por investigadores como Eubeler *et al.*, (2010). A diferencia de las probetas expuestas en el ambiente marino, en las que se presentó una cantidad variada de crustáceos y moluscos (principalmente ostiones) como lo muestra claramente las figuras 7.18 y 7.34; las probetas expuestas en el agua de río presentan escasa presencia de macro organismos (Figuras 7.23 - 7.26). En las plásticos expuestas en el mar, fue interesante observar que los ostiones utilizaron las probetas de plástico como sostén para su desarrollo (en ocasiones se observó que los ostiones se “envolvían” en el plástico), además depositaron sobre las probetas y en las trampas un pegamento que hace que se puedan proteger de los depredadores; este depósito contribuye a la pérdida de las características mecánicas del material, siendo más notable en las muestras colonizadas mayoritariamente por esta especie. Esta situación influye en la dispersión de los valores de elongación a la ruptura; además se puede inferir que probablemente esta es una de las formas como los plásticos ingresan a la cadena trófica, pues este “mimetismo” utilizado por los crustáceos podría confundir a algunas especies, tales como organismos de la súper familia Chelonioidea y Písces depredadores naturales de los ostiones. Por otra parte, además de crustáceos y anélidos, se encontraron diferentes tipos de algas, las cuales no se caracterizaron ni cuantificaron (Figura 7.38).

En los dos medios el PEAD oxodegradable previamente fotooxidado, fue el que presentó el mayor deterioro, seguido del PEAD oxodegradable; los fragmentos de PEAD oxodegradable de las probetas expuestas en el mar fueron de menor tamaño, comparados con las probetas expuestas en río; sin embargo las fragmentos en la mayoría de los caos se recuperaron; por tanto, se puede deducir de este comportamiento, que el material aún con oxidación previa y agente prodegradante no alcanza la mineralización en ambientes acuosos; de donde se infiere que la tecnología prodegradante no parece solucionar en estos casos el problema de los plásticos, que aun cuando no se diseñan estos materiales para que se dispersen en el medio ambiente, es una constante en la actual sociedad, por falta de cultura ciudadana, políticas públicas, además de la responsabilidad extendida del productor.

Se admite que el agente prodegradante cumple su función de permitir la fragmentación más no asegura la degradación total. Además, no se puede menospreciar la influencia de otras sustancias agregadas al plástico para dar durabilidad, flexibilidad, resistencia a la radiación UV, etc., lo cual estabiliza el material; sustancias que además pueden conferir toxicidad como ha sido ampliamente estudiado (Halden, 2015; Oberbeckmann *et al.*, 2015; Pal *et al.*, 2014).

8.5 Degradación en ambientes naturales, medición del porcentaje de elongación.

El seguimiento a la degradación de los materiales poliméricos se puede desarrollar utilizando diferentes técnicas. Una de las técnicas más comunes para medir la degradación es a través

Estudio de la biodegradabilidad y ecotoxicidad de plásticos oxodegradables

de los cambios en las propiedades mecánicas. La pérdida paulatina de la elongación se relaciona con la deformación de los plásticos (como el polietileno), la cual a su vez, es función de la estructura, regularidad de la cadena, cristalinidad, tamaño y distribución de tamaños, y no solamente de la estructura química. La estructura química es quizás el factor más constante de estos materiales, más no sus tamaños, puesto que en el proceso de fabricación, los industriales utilizan cantidades promedio del 10% de plásticos reciclados (información obtenida a través de entrevista con productores), lo cual disminuye la homogeneidad del material. Hay que mencionar además que la variación del porcentaje de elongación de estos materiales se relaciona con la historia de los procesos térmicos y el tiempo de deformado.

En este orden de ideas, se debe tener en cuenta la posibilidad de entrecruzamientos de cadenas que restringen el movimiento molecular, proceso de naturaleza irreversible (Lorenzo, 1987). Se puede inferir que esta situación se presentó en la foto degradación del PEAD oxodegradable, en el cual la elongación a la ruptura varía en forma no lineal (Figura 7.4), mientras que el PEAD convencional disminuye su porcentaje de elongación a la ruptura en la medida que aumenta el proceso de envejecimiento acelerado en laboratorio, además no se puede desconocer que el proceso de fotooxidación fue también de naturaleza térmica porque se trabajó a temperaturas próximas a 60 °C.

Se determinó que todos los materiales tienden a perder sus propiedades mecánicas (elongación a la ruptura) durante el proceso de intemperismo natural y lo hacen a velocidades diferentes (Figuras 8.14 y 8.31). Particularmente el plástico PEAD oxodegradable fotooxidado perdió las propiedades mecánicas en los primeros 30 días, por cuanto no se pudieron registrar valores de elongación en el primer muestreo que se desarrolló 30 días después de iniciada la exposición. Este hecho se presentó tanto en ambiente natural acuoso marino como de río, como consecuencia del tratamiento previo de intemperismo acelerado y a la presencia de agente prodegradante; las evidencias permiten inferir que el agente prooxidante es el responsable de dicho comportamiento contrastado con el plástico PEAD convencional fotooxidado, el cual presenta un leve aumento del porcentaje de elongación bajo las mismas condiciones de exposición, en el mismo periodo de tiempo.

Siguiendo con lo sucedido a las muestras de PEAD oxodegradable fotooxidado. Algunos fragmentos atravesaron la malla de la trampa (pues su tamaño de partícula fue inferior a 2 mm de diámetro), de acuerdo con Oberbeckmann *et al.*, (2015) estarán en la columna de agua como contaminantes o magnificando la contaminación mediante el transporte de compuestos orgánicos hidrofóbicos peligrosos a los animales marinos (Oberbeckmann *et al.*, 2015); también son depósitos de microorganismos (hongos, bacterias) que podrán ser transportados a diferentes lugares del planeta.

De igual forma, PEAD oxodegradable original (sin fotooxidación) pierde sus propiedades mecánicas las cuales se pudieron registrar para algunas probetas hasta 90 días de exposición en los dos medios; además se encontró que los porcentajes de elongación a la ruptura son

Estudio de la biodegradabilidad y ecotoxicidad de plásticos oxodegradables

menores en ambiente marino respecto a ambiente de río. Se podría relacionar este comportamiento con las características diferentes de los medios, se encuentra que parámetros tales como la salinidad y los sólidos totales en el agua marina, son en promedio 300 y 460 veces superiores a los encontrados en el agua de río, lo cual puede incidir en la mayor degradación en ambiente salino con respecto al ambiente en agua dulce.

Por lo que se refiere a los plásticos PEAD convencional y PEAD convencional fotooxidado, durante los primeros 60 días de exposición, se comportan de manera similar tanto en agua de mar como de agua de río; después de este periodo de tiempo son diferentes (Figura 7.39).

Observando los valores de elongación en forma conjunta en los dos medios (Tabla 7.20), se encontró que el P-valor es cero en los casos posibles de comparar (hasta 90 días), por tanto el medio influyó en la degradación de los materiales. Se debe agregar que no se tienen en cuenta el PEAD oxodegradable fotooxidado por cuanto debido a su fraccionamiento total, no fue posible el registro del porcentaje de elongación a la ruptura en ninguno de los medios.

Cabe añadir que los materiales expuestos en el río no exhibieron un patrón de comportamiento regular. Las condiciones de exposición de las probetas del río pudieron variar con las variables climáticas (estación lluviosa y estación seca), dado que ocasionó cambios en los parámetros de calidad del agua y además se infiere que la carga contaminante que arrastra el río, especialmente grasas y aceites ocasionó que la microflora y micro fauna sobre las probetas desapareciera.

8.6 Degradación en ambientes naturales, índice de carbonilo

En todos los casos, el IC fue mayor para las muestras expuestas en ambiente marino y el mayor IC se registró en las muestras de PEAD previamente fotooxidado, seguido de PEAD oxodegradable, por tanto, se infiere una fuerte influencia del aditivos prodegradante. La aparición de nuevas bandas de absorción, demostró proceso de oxidación. Absorciones aparecidas entre 1800 y 1600 cm^{-1} , se atribuyen al grupo funcional carbonilo y esta información coincide con lo publicado por otras investigaciones (Muthukumar *et al.*, 2014).

De las figuras 7.17 para ambiente marino y figura 7.33 para ambiente río, se pueden resaltar dos diferencias importantes. La primera hace referencia al tipo de material: los mayores valores de IC se registraron para el PEAD oxodegradable, tanto fotooxidado como sin fotooxidación previa, siendo mayor en el previamente fotooxidado. La segunda diferencia importante, se relaciona con la evolución del IC, se determinó que aumenta inicialmente y luego disminía lo cual es coincidente con lo encontrado por otros investigadores (De la Orden *et al.*, 2015; Muthukumar *et al.*, 2014). Se observó la presencia de nuevos enlaces carbono-oxígeno doble hacia 1712 cm^{-1} , que es una absorción propia de carbonilos; otra banda que se ha encontrado es cerca de 1030 cm^{-1} , atribuida a tensiones carbono-oxígeno con enlace sencillo, datos

Estudio de la biodegradabilidad y ecotoxicidad de plásticos oxodegradables

registrados en las tabla 7.4 y 7.8 para ambiente marino y de río respectivamente, absorciones que indican que el material sufrió oxidación.

No obstante, es necesario aclarar que las tensiones de los grupos carbonilo no indican plenamente el grado de degradación, posiblemente muchos grupos oxidados formados ya no forman parte de la cadena y es así como resulta arriesgado utilizar el IC como prueba cuantitativa de la degradación. Los mecanismos de fotooxidación (Figuras 6.3; 6.4), a través de formación de radicales tanto con Norrish I como Norrish II, permiten predecir que se pueden producir moléculas de bajo peso molecular (ácidos orgánicos) debido a la presencia de radicales hidroxilo, que son abundantes en la naturaleza y eventualmente las moléculas formadas podrían solubilizarse en el medio acuoso y por tanto no habría una señal FTIR para su detección. Además el proceso de degradación es superficial. La técnica FTIR, por sí sola no podrá informar acerca del proceso de degradación, es por ello que se combina con otras técnicas, tales como la calorimetría diferencial, resonancia magnética y más precisamente con cromatografía de exclusión molecular mejorando la robustez analítica.

8.7 Degradación en ambientes naturales y la presencia de microorganismos.

Los macro y microorganismos observados pueden estar involucrados en la biodegradación del polímero. No existe un acuerdo con respecto a la masa molar capaz de ser metabolizada por los microorganismos, se considera que tamaños menores a 10^4 g.mol⁻¹ podrían ser viables para ataque microbiano (Ojeda *et al.*, 2009). Además, se ha discutido que la colonización de los polímeros es la primera fase para la biodegradación (Restrepo-Flórez *et al.*, 2014), tal como ocurrió con las muestras expuestas en mar y río en las cuales se encontró una gran cantidad de microorganismos, siendo siempre en mayor extensión en las probetas expuestas en el mar.

Se observaron más de 12 morfotipos de hongos y se encontraron diferentes clases de bacterias. Dentro de los hongos identificados se registraron cuatro géneros (*Aspergillus*, *Alternaria*, *Penicillium*, *Zygomycota*), los más frecuentemente encontrados fueron *Aspergillus* y *Penicillium*; hongos que se aislaron en la mayoría de los plásticos expuestos; además, el género *Penicillium* se encontró en las muestras del agua del lugar de inmersión de los plásticos, creció sólo después de ocho días de incubación. Otros investigadores han encontrado estas especies. Además los resultados de las pruebas microbiológicas para *Shigella* y *Salmonella* cultivadas en medio específico fueron negativos, en los dos medios de exposición (<10 UFC/mL).

Sudhakar *et al.* (2008) por ejemplo, reportan diferentes especies de hongos (*Aspergillus*, *P. funiculosum*, *P. pullulans*), bacterias (*P. aeruginosa*, *B. cereus*, bacteria *Coryneforme*, *Bacillus sp.*, *Mycobacterium*, *Nocardia*, *Corynebacterium* y *Pseudomonas*) y *Actinomycetales*, los investigadores asumen que las condiciones de oxígeno disuelto, temperatura, humedad, son apropiadas para biodegradación, lo cual permite inferir que dadas las mejores condiciones

Estudio de la biodegradabilidad y ecotoxicidad de plásticos oxodegradables

determinadas en dichos parámetros respecto a la calidad del agua, las probetas expuestas podrían sufrir biodegradación; sin embargo, los agujeros y orificios, que son las marcas de biodegradación más frecuentes, no se evidenciaron ampliamente, excepto en el PEAD oxodegradable previamente fotooxidado, en el cual la fragmentación fue su comportamiento típico desde el primer mes de exposición en ambos ambientes, señal que el deterioro se debe en gran medida a la fotooxidación previa. El género *Bacillus*, también reportado por Roy *et al.*, (2006), y bacterias como la *P. aeruginosa*, reportada por Sen y Raut (2015), son microorganismos que pueden provocar degradación de las películas de PE (Gu, 2007; Nowak *et al.*, 2011); particularmente la *P. aeruginosa*, es un bacilo conocido por ser productor de catalasa y oxidasa, enzimas que podrían coadyuvar a la degradación (Albertsson y Karlsson, 1990) del polímero. Otros reportes han sido elaborados sobre la influencia en la biodegradación de polietileno utilizando *Rhodococcus*, bacteria Gram positiva, se afirma que esta bacteria forma biopelícula sobre el plástico contribuyendo a su degradación (Koutny *et al.*, 2006). Además, la presencia de mezcla de microorganismos ejerce efectos sinérgicos que aumentan la probabilidad de degradación de los plásticos, teniendo en cuenta que la viabilidad de las cepas sobre la superficie de los materiales estudiados se correlaciona con un aumento concomitante en la densidad de materia orgánica (proteína) o de la biomasa, por ello los estándares recomiendan inóculos naturales (ASTM D6691-17).

Las evidencias sugieren que el mecanismo de degradación de las muestras de la presente investigación fue más de carácter abiótico que biótico, atendiendo características del proceso tales como previa fotooxidación, presencia de aditivo, radiación solar, temperatura, oxígeno disuelto, salinidad, que dan como resultado la modificación de propiedades físicas, y químicas como el aumento del IC, registrado en los primeros 3 meses. La degradación abiótica se puede explicar atendiendo la cristalinidad del material; el PEAD es cristalino, con escasas regiones amorfas que es donde se inicia la degradación de acuerdo con lo expresado por algunos investigadores (Chandra y Rustgi, 1998; Eldsäter *et al.*, 2000), y por tanto la difusión del oxígeno o del agente degradador dentro de la matriz del polímero es compleja.

La baja degradación de los materiales ensayados, está conforme con el estudio reciente de bolsas plásticas analizadas en sedimentos por un periodo de 98 días en condiciones aerobias y anaerobias y los resultados concluyeron que no hay signos de biodegradación en los materiales y por tanto los sedimentos marinos se convierten en un sumidero a largo plazo para los residuos plásticos (Nauendorf *et al.*, 2016), de la misma manera que se han encontrado microplásticos en sistemas acuáticos del mundo, que incluso llegan a las cadenas tróficas, residuos de plásticos que se han encontrado en diferentes especies (Gall y Thompson, 2015).

Las investigaciones antes mencionadas muestran que no existe una evidencia clara sobre la degradación provocada por los microorganismos en el PEAD con o sin aditivos, debido fundamentalmente a que la degradación no se logra en periodos cortos de exposición y ratificando que estos materiales necesitan atemperarse en condiciones de radiación y/o temperatura muy específicos de tal forma que se degraden las cadenas para lograr masas

Estudio de la biodegradabilidad y ecotoxicidad de plásticos oxodegradables

molares bajas y suficiente grado de aleatoriedad en los grupos funcionales para que las enzimas de los microorganismos puedan actuar, como lo hacen en polímeros naturales tales como las proteínas.

8.8 Degradación en ambiente controlado de laboratorio

Diferentes normas se han empleado para evaluar la biodegradación de plásticos en condiciones controladas de laboratorio. De esa batería compleja de métodos y criterios de evaluación se decidió operar bajo el método propuesto por la norma ASTM D6691-17.

La metodología de la prueba fue simple y con relativa aproximación a ambientes reales, que fue una característica importante en la toma de decisiones sobre su elección. En el experimento, la única fuente de carbono no fue el plástico, pues al ser inóculo natural éste contiene materia orgánica que puede ser utilizada por los microorganismos, y es lo más próximo a las condiciones naturales donde ocurren procesos cometabólicos. Si esta premisa es verdadera podría aumentar la relevancia de los resultados de las pruebas realizadas y podría hacerse un seguimiento de la molécula utilizada como fuente anexa de carbono; en este caso la celulosa fue el control positivo. Otra ventaja de haber usado un inóculo natural se relaciona con el contenido de sustancias minerales que se espera hayan coadyuvado al desempeño adecuado de los microorganismos.

Durante el primer mes observado no se encontraron diferencias en el comportamiento en los reactores, probablemente debido al periodo de adaptación de los microorganismos. Después de un mes de observación se inició la fase de formación de dióxido de carbono, principalmente en el control positivo, esto fue una buena señal que indicó que el sistema respirométrico estaba funcionando en forma correcta. Sin embargo no se logró el porcentaje de producción de dióxido de carbono esperado, que según la norma no deber ser inferior al 70% del esperado. Esto indica que la mineralización fue muy baja en todos los biorreactores, incluyendo el control positivo.

La cantidad de dióxido de carbono producido fue semejante en los reactores, incluyendo el reactor control positivo. Aunque esta situación no es un problema en sí, el hecho que la celulosa cristalizada no se degradara en el porcentaje esperado, no permitió validar el experimento de biodegradación bajo condiciones controladas. Por tanto, es preciso encontrar un control positivo que se degrade más fácilmente.

Por otro lado, se puede explicar hipotéticamente que la cantidad de microorganismos es muy baja y no logra adaptarse completamente a las condiciones del experimento. Es recomendable trabajar con microorganismos que se hayan adaptado a los plásticos de prueba, que sean propios del lugar de toma del inóculo, de esta forma se evitan los sesgos de utilización de microorganismos con comprobada actividad sobre los materiales pero que no se encuentren en lugares naturales o que los microorganismos necesiten una mayor tiempo de resiliencia a las

Estudio de la biodegradabilidad y ecotoxicidad de plásticos oxodegradables

condiciones del ensayo. Las pruebas de biodegradabilidad normalizadas deben contar con metodologías experimentales simples y al mismo tiempo aproximarse lo más posible a los fenómenos que realmente suceden en la naturaleza (Vázquez-Rodríguez y Beltrán-Hernández, 2004); sin embargo se han introducido, recientemente, modelos para relacionar la biodegradación con la cantidad de dióxido de carbono formado en ambientes controlados (Guo *et al.*, 2012).

Varios factores pudieron afectar el resultado de la prueba. Se puede resaltar, en primera instancia, la obtención y adaptación del inóculo, debe cuidarse que se mantengan las condiciones lo más cercanas posibles a su estado natural, enriqueciendo la posibilidad de afectación de las poblaciones microbianas. En segundo lugar, aun cuando la cantidad de oxígeno presente en los reactores se mantuvo constante, una aireación permanente con oxígeno nuevo podría mejorar la prueba. En tercer lugar, se debe garantizar un grado alto de contacto entre los microorganismos y los materiales de ensayo a través de un proceso permanente de agitación de los reactores, logrando mantener la dispersión de los materiales en el inóculo. En cuarto lugar, la luminosidad, se debe garantizar que los reactores reproduzcan fielmente las condiciones naturales de los ecosistemas. Aunque el sistema fue relativamente sencillo de construir, existen en el mercado sistemas comerciales simples y acoplados a cromatografía u otro detector para desarrollar pruebas de biodegradabilidad, los cuales minimizan los errores en las mediciones por posibles fugas en el momento de recambio de reactores y dan respuestas automáticas, evitando en gran medida la manipulación que puede inducir errores en las medidas.

8.9 Degradación, consideraciones finales

Cabe señalar con respecto a la incidencia del aditivo prooxidante, que los fabricantes de estos aditivos para plásticos no señalan directamente que estén diseñados para mineralizar las moléculas de polímero, sino que es de esperar que al fragmentar las moléculas poliméricas a sustancias de baja masa molecular, se posibilite la introducción en ellas de grupos funcionales (ácidos, cetonas, aldehídos, alcohol) de tal forma que el resultado final del proceso conduzca a la mineralización. Sin embargo no se informa sobre la cinética del proceso y se da un salto de la probabilidad de fragmentación a la mineralización.

Al parecer la cinética de mineralización de los plásticos, aún desconocida, es muy lenta. Teniendo en cuenta el tiempo de exposición de los materiales en los dos ambientes estudiados en la presente investigación, no se encontró evidencia que ratifique o que valide el supuesto de bioasimilación completa.

De cualquier forma, la degradación también se puede evidenciar por la presencia de grupos funcionales y medición de la masa molecular promedio. Se infiere que la oxidación se presenta en la medida que el proceso de β -oxidación se desarrolla puesto que éste es el responsable del desdoblamiento de la cadena polimérica, lo cual se evidenció a través de la aparición de

Estudio de la biodegradabilidad y ecotoxicidad de plásticos oxodegradables

grupos oxidados, fundamentalmente grupos carbonilo con absorción FTIR alrededor de 1715 cm^{-1} (Figuras 8.16 y 8.32). Desde la perspectiva de la fotooxidación este aspecto es fundamental, porque el plástico debe ser hidrofílico, para apoyar el proceso de biodegradación por parte de los microorganismos. Se ha sugerido que el polímero debe tener una masa molar $\approx 40000 \text{ g.mol}^{-1}$, que sea hidrófilo (Wiles y Scott, 2006; Daglen y Tyler, 2010) y posibilitar la degradación con la intervención de microorganismos.

Para el caso del PEAD oxodegradable, se esperaría que la fotooxidación previa y el agente prodegradante, provocaran en él un mayor proceso de degradación comparativamente con el PEAD convencional, en la medida que puede presentar grupos cromóforos (incorporación de grupos carbonilo) o que los aditivos (metales) facilitan las reacciones de oxidación (típicamente una auto oxidación) y por tanto el plástico se degrade bien sea en forma biótica o en forma abiótica.

8.10 Toxicidad

Mucho se ha especulado sobre la contaminación de los sistemas acuosos del mundo. Existe una gran cantidad de información y publicaciones sobre flujos de diferentes contaminantes inorgánicos y orgánicos, entre ellos los plásticos. De estos últimos, se encuentran evidencias de su existencia en diferentes formas y tamaños, en cualquier lugar del planeta; constituyen entre 60-80% de la basura marina (Bejgarn *et al.*, 2015), siendo los más abundantes las poliolefinas, de quienes se ha sostenido son inertes químicamente, y aún con sustancias prodegradantes, como almidón o metales de transición como el manganeso, configuran un problema físico, químico y biológico para las especies presentes en cuerpos de agua, en los sedimentos y en el suelo. Particularmente el manganeso está asociado a procesos neuro conductuales (Park y Berg, 2017).

Por tanto, evaluar la toxicidad de PEAD convencional y oxodegradable es una tarea compleja. Demostrar que los plásticos son ecotóxicos demanda ampliar el panorama conceptual sobre evaluación de ecotoxicidad a través de una serie de normas en las que se selecciona un organismo que se expondrá al agente tóxico. Las interacciones en sistemas reales son extremadamente complejas, basta con señalar las relaciones inter-especies e intra-especies acompañadas estas de las diferentes sustancias que constituyen el medio, el metabolismo y parámetros abióticos, además deben considerarse las interacciones entre los diferentes estados de agregación presentes en condiciones naturales reales.

Separándonos de este complejo entramado de interacciones, se procedió a simplificar el ensayo en laboratorio con las siguientes observaciones. En el caso de los PEAD analizados se encontró que en ningún caso de los materiales ensayados mostró toxicidad hacia la microalga, bajo las condiciones del experimento. Teniendo en cuenta que la etapa exponencial de la *Chlorella* sp, finaliza en promedio a los 15 días (Figura 7.42), se continuó la observación hasta 60 días, periodo durante el cual no se adicionaron nutrientes con el fin de determinar la

Estudio de la biodegradabilidad y ecotoxicidad de plásticos oxodegradables

influencia de los plásticos sobre la *Chlorella* sp, para largos periodos de exposición. Al parecer este nuevo agente de estrés no marcó ninguna diferencia entre los biorreactores y la microalga mantiene sus características morfológicas de manera uniforme, como se puede observar en las figuras 7.46-7.47. La disminución de la absorbancia encontrada es sólo signo de cese de la fotosíntesis, corroborada con la disminución de la absorbancia y por tanto muerte de la microalga; este es un hecho que resulta lógico, se presume que existe ausencia de nutrientes, entre ellos el nitrógeno, lo cual en parte explica por qué el microorganismo muere.

Otras pruebas de toxicidad se desarrollaron con concentraciones de plásticos grandes como 1.0000 g.L⁻¹ (Figura 7.49), es un valor de concentración de plástico muy alto con respecto a los que podrían presentarse en la naturaleza (Bejgarn *et al.*, 2015). Se encontró que no hay diferencias entre los materiales y no hay diferencias con respecto a los ensayos de concentraciones antes mencionadas para el periodo recomendado por la norma (72 h); de igual forma para el ciclo completo (16 días), no se observaron diferencias en el crecimiento de la biomasa, demostrado mediante ANOVA (Tabla 7.24). Los hallazgos coinciden con otros estudios, que sugieren que los intermedios de degradación y los aditivos utilizados para promover la peroxidación del polímero no producen toxicidad (Wiles y Scott, 2006), hecho observado en las pruebas realizadas a las diferentes concentraciones.

Sin embargo, en otras investigaciones se ha encontrado que las algas marinas, como *Scenedesmus*, tienen capacidad de adsorber nanoplásticos especialmente cuando tienen carga positiva (Wright *et al.*, 2013); mientras que otros investigadores han destacado que a falta de rutas metabólicas o enzimáticas disponibles en los microorganismos filtradores, se hace improbable que los microplásticos pueden ser absorbidos o digeridos y por tanto se podrían considerar bioinertes (Andrady, 2011); sin embargo pueden ingresar a través de las membranas celulares e incorporarse en los tejidos después de la ingesta, en el caso de organismos superiores. Muchos estudios han demostrado la influencia de los plásticos en el ambiente (Barnes *et al.*, 2009; Bejgarn *et al.*, 2015; Gregory, 2009; Koelmans *et al.*, 2014; Teuten *et al.*, 2009). En el caso de los invertebrados marinos se ha determinado que factores, tales como tamaño, color, abundancia y densidad, contribuyen a la biodisponibilidad de los plásticos a través de la cadena trófica; además los micro plásticos no sólo pueden afectar a las especies a nivel de organismo sino que podrían afectar la capacidad de modificar la estructura de la población (Wright *et al.*, 2013).

Por otra parte, atendiendo la definición de ecotoxicología como la ciencia dedicada al estudio de los efectos adversos de los productos químicos en la estructura de los ecosistemas, las funciones y la biodiversidad (Tarazona *et al.*, 2014), no es posible afirmar que los plásticos no alteran el ecosistema; cuando en condiciones reales, lo observado fue el desarrollo de deformaciones en algunos moluscos, alojamiento de organismos y de sustancias dentro de las trampas de exposición, características que no se presenta en condiciones controladas de laboratorio. Las pruebas de toxicidad efectuadas en laboratorio solo representan una parte mínima de las interacciones que se pueden presentar en un ecosistema real; para el caso de

Estudio de la biodegradabilidad y ecotoxicidad de plásticos oxodegradables

la microalga, en las condiciones de laboratorio se encuentra libre de amenazas de parte de otros organismos, no tiene depredadores y las condiciones para la supervivencia están dadas, excepto que el lixiviado de los plásticos fuese extremadamente tóxico.

La no afectación al microorganismo de prueba no significa que los plásticos oxodegradables sean una solución para evitar la contaminación de los cuerpos de agua dulce o agua salada, en términos de la definición de toxicología como la ciencia que describe y predice la conducta de las sustancias en el medio ambiente y las respuestas biológicas del sistema, se podría clasificar a los plásticos como ecotóxicos en la medida de los efectos adversos que está causando en los ecosistemas acuáticos son ampliamente conocidos (Barnes *et al.*, 2009; Gall y Thompson, 2015; Meeker *et al.*, 2009; O'Brine y Thompson, 2010; Teuten *et al.*, 2009; Thompson *et al.*, 2004; Wright *et al.*, 2013).

Capítulo IX

CONCLUSIONES

9 CONCLUSIONES

1. El estudio deseaba evaluar la posible degradación de los plásticos PEAD oxodegradable y convencional cuando, por equivocadas prácticas de gestión de residuos, llegan a los ríos y al mar. Se encontró que las bolsas tipo camiseta de PEAD convencional y PEAD oxodegradable exhiben propiedades (aparición, color, olor, densidad, espesor) semejantes entre sí. No se encuentra diferencia significativa en los valores iniciales de elongación a la ruptura (resistencia mecánica) del PEAD oxodegradable y el PEAD convencional, de igual forma no se registraron diferencias en sus espectros FTIR. Sin embargo, sus propiedades mecánicas, índice de carbonilo y formación de biopelícula fue diferente una vez expuestas en los dos ambientes naturales acuáticos, propiedades que indican que el medio influye en el proceso de degradación siendo más drástica en el medio marino que en el medio fluvial, sin embargo en los dos casos no hubo pérdida total de las probetas. Se infiere que no hubo mineralización completa.
2. Se encontró que los materiales responden significativamente diferente al proceso de fotooxidación, siendo el PEAD oxodegradable el material que, en términos de porcentaje de elongación, pierde en mayor medida las propiedades mecánicas para iguales periodos de fotooxidación en condiciones controladas de laboratorio. Lo cual ratifica la afirmación anterior y permite inferir que el plástico oxodegradable se degrada en mayor medida en el tiempo. Se debe aclarar que PEAD oxodegradable fotooxidado se fragmentó desde el primer mes de exposición en los dos ambientes naturales, por tanto perdió completamente sus propiedades mecánicas, lo que implica que las condiciones de envejecimiento acelerado (degradación abiótica) en laboratorio ocasionan una mayor degradación.
3. En la exposición en ambientes naturales se encontró que todos los materiales de ensayo fueron colonizados por diferentes organismos marinos (macro y microorganismos), algunos de ellos con adherencia muy pronunciada y difícil de remover, por cuanto es causa de degradación. La cantidad de biopelícula fue mayor en las probetas expuestas en el mar. Las pruebas microbiológicas practicadas permitieron encontrar hongos y bacterias que tradicionalmente se han utilizado en pruebas de biodegradación en condiciones controladas de laboratorio.
4. Para el caso de las probetas expuestas en el mar después de 90 días, fue imposible registrar el porcentaje de elongación de los plásticos; mientras que las probetas expuestas en el río, PEAD convencional y convencional fotooxidado, se registraron valores de elongación a la ruptura durante todo el periodo de exposición. En definitiva se concluye que el medio influye en la degradación de los plásticos y que sus cinéticas de degradación son diferentes.
5. Se confirmó la oxidación de los plásticos a través del IC, siendo el PEAD oxodegradable fotooxidado el material con el mayor grado de oxidación y por tanto el

Estudio de la biodegradabilidad y ecotoxicidad de plásticos oxodegradables

material más degradado. Examinando los valores registrados como IC se encontró que los plásticos expuestos en el río se oxidan en menor proporción que los plásticos expuestos en el mar, lo que ratifica la cinética de degradación diferenciada en los dos ambientes.

6. Si se acepta que la fotooxidación previa de los materiales es la causa de la degradación de los plásticos en este experimento, se esperaba que el PEAD convencional fotooxidado se degradara en iguales periodos de tiempo, esto no fue lo medido, razón por la cual se asume que el agente prodegradante del PEAD oxodegradable es el responsable de la mayor degradación encontrada en los plásticos estudiados.
7. Avanzando en este razonamiento se puede afirmar que de los plásticos ensayados durante 180 días de observación, sólo el PEAD oxodegradable fotooxidado se fragmentó en gran proporción y en segundo lugar lo hizo el PEAD oxodegradable, de donde se infiere que los plásticos no se bioasimilan y que si ocurre bioasimilación es muy baja; así mismo la pérdida de masa medida puede deberse a desgaste mecánico y no necesariamente a mineralización o a los dos simultáneamente, lo que permite inferir que es incierto el destino final en la naturaleza de estos materiales.
8. La prueba de biodegradabilidad en condiciones controladas, siguiendo la norma ASTM D 6991, no fue sensible teniendo en cuenta los bajos valores de mineralización alcanzados.
9. Se encontró que la microalga *Chlorella* sp, presentó un buen desempeño como indicador de toxicidad. Las pruebas desarrolladas con diferentes concentraciones (incluso concentraciones superiores a las registradas en ambientes acuáticos) indican que los plásticos resultaron no tóxicos para el microorganismo de prueba. Estos resultados no indican que los materiales no puedan causar efectos perjudiciales para los ecosistemas, pues las pruebas se desarrollan en condiciones muy particulares, en presencia de un único organismo y el plástico como factor de estrés.
10. De manera general se encontró que aun cuando los plásticos oxodegradable sufren degradación, la tecnología prodegradante no cambiará el panorama de contaminación de los cuerpos de agua dulce ni de los océanos y mares del mundo. La tecnología no podrá resolver el problema de la inadecuada gestión de los residuos plásticos. La solución es la generación de políticas públicas que desestimen la generación y el uso de bolsas, bien sea a través de gravámenes sobre los materiales o por la generación de incentivos para la investigación que conduzca a la creación de materiales que realmente se puedan reutilizar, reciclar y al final de su uso puedan transformarse a formas inocuas para el ambiente.
11. En general se puede afirmar, bajo las evidencias mostradas, que fue posible medir la biodegradación de los materiales en condiciones naturales de exposición y que estos materiales no resultaron ecotóxicos para el microorganismo de prueba en condiciones controladas de laboratorio, lo cual permite validar la hipótesis propuesta. Sin embargo,

Estudio de la biodegradabilidad y ecotoxicidad de plásticos oxodegradables

no fue posible medir la biodegradación de los plásticos en laboratorio puesto que la cantidad teórica del material control positivo fue inferior al recomendado por el estándar.

CAPÍTULO X

RECOMENDACIONES

10 RECOMENDACIONES

Es necesario mejorar las técnicas de caracterización de la biodegradación en condiciones controladas de laboratorio en medio acuoso, utilizando métodos acoplados que ayuden a estimar tanto parámetros físicos (cambio de temperatura, por ejemplo) y bioquímicos (formación de metabolitos) de manera simultánea y químicos (aparición de nuevas sustancias en el medio de reacción). La estimación de estos parámetros facilita la interpretación de los posibles efectos de las materiales plásticos en el ambiente.

Las pruebas de biodegradación en condiciones controladas deberían trabajarse con microorganismos que se hayan adaptado a los plásticos de prueba, que sean propios del lugar de toma del inóculo, de esta forma se evitan los sesgos de utilización de microorganismos con comprobada actividad sobre los materiales pero que no se encuentren en lugares naturales o que los microorganismos necesiten un mayor tiempo de resiliencia a las condiciones del ensayo. Las pruebas de biodegradabilidad normalizadas deben contar con metodologías experimentales simples y al mismo tiempo aproximarse lo más posible a los fenómenos que realmente suceden en la naturaleza. Es el caso de las corrientes marinas que aumentan el contacto entre el inóculo y los materiales plásticos, es decir, se debe garantizar un contacto íntimo entre los microbios y los materiales que se desean biodegradar. Además el patrón control positivo debe ser de más fácil degradación porque tal vez la celulosa no es la principal materia orgánica que llega al mar y por tanto los microorganismo no serán eficientes en su degradación, podría usarse sustancias con menores masas moleculares.

REFERENCIAS

- Ahmad, A., Khan, A. & Yasar, A. (2013). The potential of chlorella vulgaris for wastewater treatment and biodiesel production. *Pak. J. Bot.*, 45(S1), 45(S1): 461-465.
- Al-Salem, S. M., Lettieri, P. & Baeyens, J. (2010). The valorization of plastic solid waste (PSW) by primary to quaternary routes: From re-use to energy and chemicals. *Prog. Energ. Combust.* 36, 103–129. doi:10.1016/j.pecs.2009.09.001
- Albertsson, A., Barenstedt, C. & Karlsson, S. (1994). Abiotic degradation products from enhanced environmentally degradable polyethylene. *Acta Polym* 45, 97–103. doi: 10.1002/acp.1994.010450207
- Albertsson, A. C. & Karlsson, S. (1990). The influence of biotic and abiotic environments on the degradation of polyethylene. *Prog. Polym. Sci.* 15, 177–192. doi:10.1016/0079-6700(90)90027-X.
- Aly, M. & Mona, A. (2008). Evaluation of Spirulina Platensis as Bio-Stimulator for Organic Farming Systems. *J. Genet. Eng. Biotechnol.*, 6(2), 1–7. doi:10.5897/AJAR2013.7953
- Ammala, A., Bateman, S., Dean, K., Petinakis, E., Sangwan, P., Wong, S., Yuan, Q., Yu, L., Patrick, C. & Leong, K. (2011). An overview of /degradable and biodegradable polyolefins. *Prog. Polym. Sci.* 36, 1015–1049. doi:http://dx.doi.org/10.1016/j.progpolymsci.2010.12.002
- Andrady, A. (2011). Microplastics in the environment. *Mar Pollut Bull.* 62, 1596-1605. doi: 10.1016/j.marpolbul.2011.05.030
- Artham, T., Sudhakar, M., Venkatesan, R., Nair, C. M., Murty, K.V.G.K. & Doble, M., (2009). Biofouling and stability of synthetic polymers in sea water. *Int. Biodeter. Biodegr.* 63, 884–890. doi:10.1016/j.ibiod.2009.03.003
- ASTM D5208-14 Práctica estándar para la exposición ultravioleta fluorescente (UV) de plásticos fotodegradables.
- ASTM D5210-07 Biodegradación anaerobia de materiales plásticos en presencia de lodos residuales municipales.
- ASTM D5526-12 (2001). Métodos de ensayo de biodegradación anaerobia de materiales plásticos en condiciones aceleradas de relleno sanitario.
- ASTM D6400-12 Especificación de estándares para plásticos compostables.
- ASTM D6691-17 Método de prueba estándar para determinar la biodegradación aeróbica de materiales plásticos en el medio marino por un consorcio microbiano definido o inóculo de agua de mar natural.
- ASTM D6954-04 (2013). *Exposición y ensayo de plásticos que se degradan en ambientes combinados* de oxidación y biodegradación
- Avio, C. G., Gorbi, S. & Regoli, F. (2015). Experimental development of a new protocol for extraction and characterization of microplastics in fish tissues: First observations in commercial species from Adriatic Sea. *Mar Environ Res*, 111, 18-26. doi: 10.1016/j.marenvres.2015.06.014
- Azis, P.K.A., Ai-tisan, I. & Sasikumar, N., (2001). Biofouling potential and environmental factors of seawater at a desalination plant intake. *Desalination* 135, 69–82. doi: 10.1016/S0011-9164(01)00140-0
- Azovsky, A. I., Tikhonenkov, D. V. & Mazei, Y. A. (2016). An Estimation of the Global Diversity and Distribution of the Smallest Eukaryotes: Biogeography of Marine Benthic Heterotrophic Flagellates. *Protist*, 167(5), 411-424. doi: 10.1016/j.protis.2016.07.001

Estudio de la biodegradabilidad y ecotoxicidad de plásticos oxodegradables

- Barnes, D. K., Galgani, F., Thompson, R. C. & Barlaz, M. (2009). Accumulation and fragmentation of plastic debris in global environments. *Phil. Trans. R. Soc. B* 364, 1985–1998. doi:10.1098/rstb.2008.0205 doi: 10.1098/rstb.2008.0205
- Barsanti, L. & Gualtieri, P. (2014). *Algae. Anatomy, Biochemistry and Biotechnology*. (L. L. C. Taylor y Francis Group, Ed.). Boca Raton, FL: CRC Press. doi:??
- Bejgam, S., MacLeod, M., Bogdal, C. & Breitholtz, M. (2015). Toxicity of leachate from weathering plastics: An exploratory screening study with *Nitocra spinipes*. *Chemosphere* 132, 114–119. doi:10.1016/j.chemosphere.2015.03.010
- Bergmann, M., Gutow, L. & Klages, M. (2015). Marine anthropogenic litter, *Marine Anthropogenic Litter*. doi:10.1007/978-3-319-16510-3
- Bernstein, M. & Woods, M. (2009). Plastics in oceans decompose, release hazardous chemicals, surprising new study says. *Reactions*, 2008 (2007), 2006.
- Beyler, C. L. & Hirschler, M. M. (2002). Thermal decomposition of polymers. *SFPE handbook of fire protection engineering*, 2, 111-131. doi: 10.4236/oalib.1101533
- Blair, C. & Quinn, B. *Microplastic pollutants* (2017). New York: Elsevier.
- Brassoulis, D. (2006). Mechanical behaviour of biodegradable agricultural films under real field conditions. *Polym. Degrad. Stab.*, 91(6), 1256-1272. doi: 10.1016/j.polymdegradstab.2005.09.016
- BS 8472:2011 Métodos para la evaluación de la oxobiodegradación de plásticos y de la fitotoxicidad de los residuos en condiciones controladas de laboratorio.
- Bulgakov, N., & Levich, A. (1999). The nitrogen: phosphorus ratio as a factor regulating phytoplankton community structure. *Arch. Hydrobiol.*, 146(1), 3–22. doi: 10.1127/archiv-hydrobiol/146/1999/3
- Cantú, P. C. 2000. Toxicología. *RESPYN*, 1 (2), 1.
- Calow, P., & Forbes, V. E. (2003). Peer reviewed: does ecotoxicology inform ecological risk assessment. *Environ. Sci. Technol.*, 37, 146A–151A. doi: 10.1021/es0324003
- Chandra, R. & Rustgi, R. (1998). Biodegradable polymers. *Prog. Polym. Sci.* 1273–1335. doi:10.1016/S0079-6700(97)00039-7
- Chang, L., Lee, H., & Heng, W. (2002). Production of alginate microspheres by internal gelation using an emulsification method. *Int. J. Phytorem.*, 242(1–2), 259–262. doi: 10.1016/S0378-5173(02)00170-9
- Chang, R. (2010). *Química*, México: McGraw Hill/Interamericana editores.
- Colas, F., Vigneron, A., Felten, V., & Devin, S. (2014). The contribution of a niche-based approach to ecological risk assessment: Using macroinvertebrate species under multiple stressors. *Environ. Pollut.*, 185, 24–34. doi: 10.1016/j.envpol.2013.09.033
- Cole, M. & Galloway, T. S. (2015). Ingestion of nanoplastics and microplastics by Pacific oyster larvae. *Environ. Sci. Technol.*, 49(24), 14625-14632. doi: 10.1021/acs.est.5b04099
- Cole, M., Lindeque, P., Halsband, C. & Galloway, T.S. (2011). Microplastics as contaminants in the marine environment: a review. *Mar. Pollut. Bull.*, 62, 2588-2597. doi: 10.1016/j.marpolbul.2011.09.025
- Contreras-Flores C, Peña-Castro, J. Flores-Cotera, L. & Cañizares-Villanueva, R. (2003). Avances en el diseño conceptual de fotobiorreactores para el cultivo de microalgas. *Interciencia* 28(8): 450-456.

Con formato: Inglés (Estados Unidos)

Estudio de la biodegradabilidad y ecotoxicidad de plásticos oxodegradables

- Chiellini, E., Corti, A., D'antone, S. & Baciú, R. (2006). Oxo-biodegradable carbon backbone polymers—oxidative degradation of polyethylene under accelerated test conditions. *Polym. Degrad. Stab.* 91, 2739–2747. doi:10.1016/j.polymdegradstab.2007.03.007
- Corti, A., Muniyasamy, S., Vitali, M., Imam, S. & Chiellini, E. (2010). Oxidation and biodegradation of polyethylene films containing pro-oxidant additives: Synergistic effects of sunlight exposure, thermal aging and fungal biodegradation. *Polym. Degrad. Stab.* 95, 1106–1114. doi: 10.1016/j.polymdegradstab.2010.02.018
- Crawford, C. B., & Quinn, B. (2017). 2 - The contemporary history of plastics BT - Microplastic Pollutants (pp. 19–37). Amsterdam: Elsevier. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/B978-0-12-809406-8.00002-5>
- Daglen, B. C. & Tyler, D. R. (2010). Photodegradable plastics: end-of-life design principles. *Green Chem. Lett. Rev.*, 3(2), 69–82. <https://doi.org/10.1080/17518250903506723>
- Dahlbo, H., Poliakova, V., Mylläri, V., Sahimaa, O., & Anderson, R. (2017). Recycling potential of post-consumer plastic packaging waste in Finland. *Waste Manag.* Artículo en impreçon <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.wasman.2017.10.033>
- Danquah, M., Gladman, B., Moheimani, N. & Forde, G. (2009). Microalgal growth characteristics and subsequent influence on dewatering efficiency. *Chem Eng*, 151(1–3), 73–78. doi: 10.1016/j.cej.2009.01.047
- Debajyoti, D., Surabhi, C., & Sanjoy, B. (2005). Hydrogen production by Cyanobacteria. *Microbial Cell Factories*, 4(36), 1–11.
- De la Orden, M. U., Montes, J. M., Urreaga, J. M., Bento, A., Ribeiro, M. R., Pérez, E. & Cerrada, M. L. (2015). Thermo and photo-oxidation of functionalized metallocene high density polyethylene: Effect of hydrophilic groups. *Polym. Degrad. Stab.* 111, 78–88. doi:10.1016/j.polymdegradstab.2014.10.023.
- de Moraes, P., Stoichev, T., Basto, M.C.P, Ramos, V., Vasconcelos, V. M. & Vasconcelos M.T.S. (2014). Cyanobacterium *Microcystis Aeruginosa* reponse to pentachlorophenol and comparison wit that of the microalga *Chlorella vulgaris*. *Water research*, 52, 63-72. doi: 10.1016/j.watres.2013.12.036
- Derraik, J.G.B. (2002). The pollution of the marine environment by plastic debris: A review. *Mar. Pollut. Bull.* 44, 842–852. doi:10.1016/S0025-326X(02)00220-5
- De Tender, C., Schlundt, C., Devriese, L. I., Mincer, T. J., Zettler, E. R. & Amaral-Zettler, L. A. (2017). A review of microscopy and comparative molecular-based methods to characterize "Plastisphere" communities. *Analytical Methods*, 9(14), 2132-2143. doi: 10.1039/c7ay00260b
- Edding, M., Tala, F. & Vásquez, J. (s.f.). FALTA AÑO.Fotosíntesis, productividad y algas marinas. (E. U. de La Serena, Ed.). The biodegradation of amorphous and crystalline regions in film-blown poly (caprolactone). *Polymer (Guildf)*. 41, 1297–1304. doi:10.1016/S0032-3861(99) 00278-5
- EN 13432-2001 Envases y embalajes. Requisitos de los envases y embalajes valorizables mediante compostaje y biodegradación. Programa de ensayo y criterios de evaluación para la aceptación final del envase o embalaje.
- EN 14855-2005 Determinación de la biodegradabilidad final aerobia y desintegración de materiales plásticos en condiciones controladas de compostaje.
- UNE 53104-86 Exposición de plásticos a la radiación UV.Eriksen, N. T. (2008). The technology of microalgal culturing. *Biotechnol Lett*, 30, 1525–2536. doi: 10.1007/s10529-008-9740-3
- Eubeler, P., Bernhard, M. & Knepper, T. P. (2010). Environmental biodegradation of synthetic polymers II. Biodegradation of different polymer groups. *TrAC Trend Anal. Chem.* 84–100.

Con formato: Inglés (Estados Unidos)

Estudio de la biodegradabilidad y ecotoxicidad de plásticos oxodegradables

doi:10.1016/j.trac.2009.09.005

- Eubeler, J. P., Zok, S., Bernhard, M. & Knepper, T. (2009). Environmental biodegradation of synthetic polymers I. Test methodologies and procedures. *TrAC Trends Ana. Chem.* 28, 1057-1072. <https://doi.org/10.1016/j.trac.2009.06.007>
- Fatou, J. G., (1985). Polietileno y copolímeros. *Rev. Plásticos Mod.* 2, 3–9.
- Flemming, H. C., (1998). Relevance of biofilms for the biodeterioration of surfaces of polymeric materials. *Polym Degrad Stabil* 59, 309–315. doi: 10.1016/S0141-3910(97)00189-4
- Fontanella, S., Bonhomme, S., Brusson, J. M., Pitteri, S., Samuel, G., Pichon, G. & Delort, A. M., (2013). Comparison of biodegradability of various polypropylene films containing pro-oxidant additives based on Mn, Mn/Fe or Co. *Polym. Degrad. Stab.* 98, 875–884. doi: 10.1016/j.polymdegradstab.2013.01.002
- Forbes, V. E., Calow, P. & Sibly, R. M., (2001). Are current species extrapolation models a good basis for ecological risk assessment?. *Environ. Toxicol. Chem.* 20, 442–447. doi: 10.1002/etc.5620200227
- Gall, S. C. & Thompson, R. C. (2015). The impact of debris on marine life. *Mar. Pollut. Bull.* 92, 170–179. doi:10.1016/j.marpolbul.2014.12.041
- Gregory, M. R. (2009). Environmental implications of plastic debris in marine settings: entanglement, ingestion, smothering, hangers-on, hitch-hiking and alien invasions. *Phil. Trans. R. Soc. B* 364, 2013–2025. doi: 10.1098/rstb.2008.0265
- Grima, S., Bellon-Maurel, V., Feuilleux, P. & Silvestre, F. (2000). Aerobic biodegradation of polymers in solid-state conditions: a review of environmental and physicochemical parameter settings in laboratory simulations. *J Polym Environ.* 8(4), 183-195. doi: 10.1023/A:1015297727244
- Gu, J. D. (2007). Microbial colonization of polymeric materials for space applications and mechanisms of biodeterioration: A review. *Int. Biodeter. Biodegr.* 59, 170–179. doi:10.1016/j.ibiod.2006.08.010
- Gu, J. D. (2003). Microbiological deterioration and degradation of synthetic polymeric materials: recent research advances. *Int. Biodeter. Biodegr.* 52, 69–91. doi:10.1016/S0964-8305(02)00177-4
- Gu, J. D., Ford, T. E., Mitton, B. & Mitchell, R. (2000). Microbial degradation of polymeric materials. In: Revie, W. (Ed.), *The Uhlig Corrosion Handbook*. 2nd ed. Wiley, New York, pp. 439–460. doi:10.1016/S0964-8305(02)00177-4
- Guo, W. B., Tao, J., Yang, C., Song, C. J., Geng, W. T., Li, Q., Wang, Y. Y., Kong, M. M. & Wang, S. F. (2012). Introduction of Environmentally Degradable Parameters to Evaluate the Biodegradability of Biodegradable Polymers. *PLoS One* 7. doi:10.1371/journal.pone.0038341
- Halden, R. (2015). Epistemology of contaminants of emerging concern and literature meta-analysis. *J. Hazard. Mater.* 282, 2–9. doi:10.1016/j.jhazmat.2014.08.074
- Hanrahan, G. (2012). *Key Concepts in Environmental Chemistry*. Academic Press. California. USA
- Hernández, B. M., Rodríguez, M. C., Lozano, C. & Castilla, P. (2012). Remoción de nutrientes por tres cultivos de microalgas libres e inmovilizados. *Rev Latinoam Biotecnol Amb Algal*, 3(1), 80–94.
- Hoffman, D. J., Rattner, B. A., Burton, G. Jr., Cairns, J. & Hardback, Jr. (Editors). (2003). *Handbook of Ecotoxicology*, 2nd edition, CRC Press, Boca Raton, FL.
- Iiyoshi, Y., Tsutsumi, Y. & Nishida, T. (1998). Polyethylene degradation by lignin-degrading

Estudio de la biodegradabilidad y ecotoxicidad de plásticos oxodegradables

- fungi and manganese peroxidase. *J. Wood Sci*, 44(3), 222-229.
- ISO 6341-12 Calidad del agua - Determinación de la inhibición de la movilidad de *Daphnia magna* Straus (Cladocera, Crustacea) - Prueba de toxicidad aguda.
- ISO 14852-1999 Determinación de la biodegradabilidad aeróbica final de materiales plásticos en un medio acuoso - Método por análisis de dióxido de carbono evolucionado.
- ISO 15314-04 Guía para la determinación de la biodegradabilidad en ambiente marino.
- Isobe, A., Kubo, K., Tamura, Y., Kako, S., Nakashima, E. & Fujii, N. (2014). Selective transport of microplastics and mesoplastics by drifting in coastal waters. *Mar. Pollut. Bull.* 89, 324–30. doi:10.1016/j.marpolbul.2014.09.041
- Jabarin, S.A. & Lofgren, E.A. (1994). Photooxidative effects on properties and structure of high-density polyethylene. *J. Appl. Polym. Sci* 53, 411–423. doi:10.1002/app.1994.070530404
- Jakubowicz, I. (2003). Evaluation of degradability of biodegradable polyethylene (PE). *Polym. Degrad. Stab.* 80, 39–43. doi: 10.1016/S0141-3910(02)00380-4
- Jakubowicz, I., Yarahmadi, N. & Petersen, H. (2006). Evaluation of the rate of abiotic degradation of biodegradable polyethylene in various environments. *Polym. Degrad. Stab.* 91, 1556–1562.
- Johnston, H. J., Hutchison, G., Christensen, F. M., Peters, S., Hankin, S. & Stone, V. (2010). A review of the in vivo and in vitro toxicity of silver and gold particulates: Particle attributes and biological mechanisms responsible for the observed toxicity. *Crit. Rev. Toxicol.* 40, 328–346. doi:10.3109/10408440903453074
- Jung, J., Ree, M. & Kim, H. (2006). Acid- and base-catalyzed hydrolyses of aliphatic polycarbonates and polyesters. *Catal. Today* 115, 283–287. doi: 10.1016/J.CATTOD.2006.06.008
- Kawai, F., 2010. The biochemistry and molecular biology of xenobiotic polymer degradation by microorganisms. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 74, 1743–59. doi:10.1271/bbb.100394
- Keswani, A., Oliver, D. M., Gutierrez, T. & Quilliam, R. S. (2016). Microbial hitchhikers on marine plastic debris: Human exposure risks at bathing waters and beach environments. *Mar. Environ. Res.* 118, 10–19. doi:10.1016/j.marenvres.2016.04.006
- Kijchavengkul, T., Auras, R., Rubino, M., Ngouajio, M. & Fernandez, R. T. (2006). Development of an automatic laboratory-scale respirometric system to measure polymer biodegradability. *Polym Test.* 25(8), 1006-1016. doi: 10.1016/j.polymertesting.2006.06.008
- Knoblauch, J. A. (2009). Plastic not-so-fantastic: How the versatile material harms the environment and human health. *Sci. Am.* 1–3.
- Koelmans, A. A., Besseling, E. & Foekema, E. M. (2014). Leaching of plastic additives to marine organisms. *Environ. Pollut.* 187, 49–54. doi:10.1016/j.envpol.2013.12.013
- Koutny, M., Lemaire, J. & Delort, A.M. (2006). Biodegradation of polyethylene films with prooxidant additives. *Chemosphere* 64, 1243–1252. doi:http://dx.doi.org/10.1016/j.chemosphere.2005.12.060
- Koutny, M., Václavková, T., Matisová-Rychlá, L. & Rychlý, J. (2008). Characterization of oxidation progress by chemiluminescence: A study of polyethylene with pro-oxidant additives. *Polym. Degrad. Stab.* 93, 1515–1519. doi:10.1016/j.polymdegradstab.2008.05.007
- Krzan, A., Hemjinda, S., Miertus, S., Corti, A. & Chiellini, E. (2006). Standardization and certification in the area of environmentally degradable plastics. *Polym. Degrad. Stab.* 91(12), 2819-2833.

Estudio de la biodegradabilidad y ecotoxicidad de plásticos oxodegradables

- Kyrikou, I., Briassoulis, D., Hiskakis, M. & Babou, E. (2011). Analysis of photo-chemical degradation behaviour of polyethylene mulching film with pro-oxidants. *Polym. Degrad. Stab.* 96, 2237–2252. doi:<http://dx.doi.org/10.1016/j.polymdegradstab.2011.09.001>
- Lagus, A. (2009). Role of nutrients in regulation of the phytoplankton community in the archipelago sea, Northern Baltic sea. Painosalama Oy - Turku, Finland. Recuperado de: <http://docplayer.net/10187256-Role-of-nutrients-in-regulation-of-the-phytoplankton-community-in-the-archipelago-sea-northern-baltic-sea.html>
- Lagus, A., Suomela J., Helminen H., Sipura J. (2007). Impacts of nutrient enrichment and sediment on phytoplankton community structure in the northern Baltic Sea. *Hydrobiologia.* 579. 351-368
- Lee, H., Shim, W. & Kwon, J. (2014). Sorption capacity of plastic debris for hydrophobic organic chemicals. *Sci. Total Environ.* 470–471, 1545–1552. doi:10.1016/j.scitotenv.2013.08.023
- Li, Y., Chen, Y., Chen, P., Min, M., Zhou, W., Martínez, B., Zhu, J. & Ruan, R. (2011). Characterization of microalga *Chlorella* sp well adapted to highly concentrated municipal wastewater for nutrient removal and biodisel production. *Bioresour Technol.* 102, 513-5144. doi.org/10.1016/j.biortech.2011.01.091
- Lippsett, L. (2013). Behold the 'plastisphere': colonies of microbes flourish on tiny bits in the ocean. *Oceanus*, 50(2), 24-25.
- Lithner, D., Larsson, Å. & Dave, G. (2011). Environmental and health hazard ranking and assessment of plastic polymers based on chemical composition. *Sci. Total Environ.* 409, 3309–3324. doi:<http://dx.doi.org/10.1016/j.scitotenv.2011.04.038>
- Littler, M.M. & Littler, D.S. (1980). The evolution of thallus form and survival strategies in benthic marine macroalgae: field and laboratory tests of a functional form model. *Am. Nat.* 116, 25–44.
- Lorente, M. & Cereceda, I. (2001). Dinoflagelados. Recuperado de: <http://campus.usal.es/~delcien/doc/DINOS>.
- López, J., García, N., Jiménez, L. & Huerta, N. (2009). Crecimiento de la diatomea *Thalassiosira pseudonana* en cultivos estáticos con iluminación continua y fotoperiodo a diferentes salinidades. *BIOtecnia*, 11(1), 11–18.
- Lucas, N., Bienaime, C., Belloy, C., Queneudec, M., Silvestre, F. & Nava-Saucedo, J.E. (2008). Polymer biodegradation: Mechanisms and estimation techniques – A review. *Chemosphere* 429–442. doi:10.1016/j.chemosphere.2008.06.064
- Ma, J., Lin, Á.F., Zhang, R., Yu, W. & Lu, N. (2004). Differential sensitivity of two green algae , *Scenedesmus quadricauda* and *Chlorella vulgaris* , to 14 pesticide adjuvants. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 58, 61–67. doi:10.1016/j.ecoenv.2003.08.023
- Makavičienė, V., Andrulevičiūtė, V., Skorupskaitė, V. & Kasperovičienė, J. (2011). Cultivation of Microalgae *Chlorella* sp. and *Scenedesmus* sp. as a Potential Biofuel Feedstock. *J. Environ. Eng. Manage.*, 57(3), 21–27. doi: 10.5755/j01.ere.57.3.476
- Markou, G. & Georgakakis, D. (2011). Cultivation of filamentous cyanobacteria (blue-green algae) in agro-industrial wastes and wastewater: A review. *App. Energy.*, 88(10), 3389–3401. doi: 10.1016/j.
- Mata, M. T, Martins, A. A. & Caetano, N. S. (2010). Microalgae for biodiesel production and other applications: a review. *Renew Sustain Energy Rev.* 14, 217–231. doi: 10.1016/j.rser.2009.07.020
- Mathalon, A. & Hill, P. (2014). Microplastic fibers in the intertidal ecosystem surrounding Halifax Harbor, Nova Scotia. *Mar. Pollut. Bull.*, 81 69-7. doi: 10.1016/j.marpollbul.2014.02.018

Estudio de la biodegradabilidad y ecotoxicidad de plásticos oxodegradables

- Mattsson, K., Hansson, L. A. & Cedervall, T. (2015). Nano-plastics in the aquatic environment. *Environ. Sci. Process. Impact*, 17(10), 1712-1721. doi: 10.1039/c5em00227c
- Maznah, W., Al-Fawwaz, A. & Surif, M. (2012). Biosorption of copper and zinc by immobilised and free algal biomass, and the effects of metal biosorption on the growth and cellular structure of *Chlorella* sp. and *Chlamydomonas* sp. isolated from rivers in Penang, Malaysia. *J. Environ. Sci.* 24, 1386-1393. doi: 10.1016/S1001-0742(11)60931-5
- McIntosh, R., Kirkwood, R., Sutherland, D. & Dann, P. (2015). Drivers and annual estimates of marine wildlife entanglement rates: A long-term case study with Australian fur seals. *Mar. Pollut. Bull.* 101, 716-725. doi: 10.1016/j.marpolbul.2015.10.007
- Meeker, J. D., Sathyanarayana, S. & Swan, S. H. (2009). Phthalates and other additives in plastics: human exposure and associated health outcomes. *Phil. Trans. R. Soc. B* 364, 2097-2113. doi:10.1098/rstb.2008.0268
- Mendoza, R., Born-Schmidt, G., March, I. & Álvarez, P.. 2014. Especies invasoras acuáticas y cambio climático, en R. Mendoza y P. Koleff (coords.), *Especies acuáticas invasoras en México*. Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad, México, pp. 469-495. Recuperado de : <http://www.biodiversidad.gob.mx/especies/Invasoras/pdf/acuaticas-invasoras-cap28.pdf>
- Mitchell, D. (2017). Uso de las bolsas plásticas ha caído 25 % en 2017. *Acoplasticos*. Recuperado 10/10/2017 de: <http://www.acoplasticos.org/index.php/mnu-noti/135-ns-170809>
- Moronta, R., Mora, R. & Morales, E. (2006). Respuesta de la microalga *Chlorella sorokiniana* al pH, salinidad y temperatura en condiciones axénicas y no axénicas. *Rev. Fac. Agron. (LUZ)*. 23, 27-41. doi:
- Mueller, R. J. (2006). Biological degradation of synthetic polyesters—Enzymes as potential catalysts for polyester recycling. *Process Biochem.*, 41(10), 2124-2128. <http://doi.org/http://dx.doi.org/10.1016/j.procbio.2006.05.018>
- Muthukumar, T., Aravinthana, A., Dineshram, R., Venkatesan, R. & Doble, M. (2014). Biodegradation of starch blended high density polyethylene using marine bacteria associated with biofilm formation and its isolation characterization. *J. Microb. Biochem. Technol.* 6, 116-122. doi:10.4172/1948-5948.10001314
- Muthukumar, T., Aravinthan, A., Lakshmi, K., Venkatesan, R., Vedaprakash, L. & Doble, M., (2011). Fouling and stability of polymers and composites in marine environment. *Int. Biodeterior. Biodegrad.* 65, 276-284. doi:10.1016/j.ibiod.2010.11.012
- Naselli-Flores B. R., L. (2009). Green Algae. *Encyclopedia of Inland Waters*. Academic Press. Boca Raton, Florida, USA.
- Nauendorf, A., Krause, S., Bigalke, N. K., Gorb, E. V., Gorb, S. N., Haeckel, M., Wahl, M. & Treude, T. (2016). Microbial colonization and degradation of polyethylene and biodegradable plastic bags in temperate fine-grained organic-rich marine sediments. *Mar. Pollut. Bull.* 103, 168-178. doi:10.1016/j.marpolbul.2015.12.024
- Nowak, B., Drozd-Bratkowicz, M. & Rymarz, G. (2011). Microorganisms participating in the biodegradation of modified polyethylene films in different soils under laboratory conditions. *Int. Biodeter. Biodegrad.* 757-767. doi:10.1016/j.ibiod.2011.04.007
- NTC 4092 (2009). *Microbiología de alimentos y productos para alimentación animal. Requisitos generales y directrices para análisis microbiológicos*. Editada por el Instituto Colombiano de Normas Técnicas y Certificación (ICONTEC).
- NTC_ISO 5667-1. (1995). *Gestión ambiental. Calidad del agua. Muestreo. Directrices para el diseño de programas de muestreo*. Editada por el Instituto Colombiano de Normas Técnicas y Certificación (ICONTEC).

Estudio de la biodegradabilidad y ecotoxicidad de plásticos oxodegradables

- O'Brine, T. & Thompson, R.C. (2010). Degradation of plastic carrier bags in the marine environment. *Mar. Pollut. Bull.* 60, 2279–2283. doi:10.1016/j.marpolbul.2010.08.005
- Oberbeckmann, S., L€oder, M.G.J. & Labrenz, M. (2015). Marine microplastic-associated biofilms: a review. *Environ. Chem.* 12, 551–562. doi:10.1071/EN15069
- OCDE 201. (2011). Prueba de inhibici3n del crecimiento de algas y cianobacterias en agua dulce.
- OCDE 208-03 Gu3a de la OCDE para la prueba de productos qu3micos propuesta de actualizaci3n de la directriz 208. Prueba de Plantas Terrestres: Prueba de Crecimiento de Plantas y Pl3ntulas.
- Øiseth, S. K., Krozer, A., Lausmaa, J. & Kasemo, B. (2004). Ultraviolet light treatment of thin high-density polyethylene films monitored with a quartz crystal microbalance. *J. Appl. Polym. Sci.* 92, 2833–2839. doi: 10.1002/app.20140
- Ojeda, T., Dalmolin, E., Forte, M., Jacques, J., Bento, F. & Camargo, F. (2009). Abiotic and biotic degradation of oxo-biodegradable polyethylenes. *Polym. Degrad. Stab.* 94, 965–970. doi: 10.1371/journal.pone.0107438
- Osborn, A. M. & Stojkovic, S. (2014). Marine microbes in the Plastic Age. *Microbiology Australia*, 35(4), 207-210. doi: 10.1071/MA14066
- Oteropaternina, A., Cruzcasallas, P. E. & Velascosantamaría, Y. M. (2013). Evaluaci3n del efecto del hidrocarburo fenantreno sobre el crecimiento de *Chlorella vulgaris* (Chlorellaceae). *Acta Biol. Colomb.*, 18(1), 87-98.
- Oukarroum, A., Bras, S., Perreault, F. & Popovic, R. (2012). Inhibitory effects of silver nanoparticles in two green algae, *Chlorella vulgaris* and *Dunaliella tertiolecta*. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 78, 80-85. doi: 10.1016/j.ecoenv.2011.11.012
- Pablos, J. L., Abrusci, C., Marín, I., López-Marín, J., Catalina, F., Espí, E. & Corrales, T. (2010). Photodegradation of polyethylenes: Comparative effect of Fe and Ca-stearates as oxidant additives. *Polym. Degrad. Stab.* 95, 2057–2064. doi:10.1016/j.polymdegradstab.2010.07.003
- Pal, A., He, Y., Jekel, M., Reinhard, M. & Gin, K. (2014). Emerging contaminants of public health significance as water quality indicator compounds in the urban water cycle. *Environ. Int.* 71, 46–62. doi:10.1016/j.envint.2014.05.025
- Park, R. M., & Berg, S. L. (2017). Manganese and neurobehavioral impairment. A preliminary risk assessment. *NeuroToxicology*.
<https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.neuro.2017.08.003>
- Park J., Craggs R. & Shilton A. (2011). Wastewater treatment high rate algal ponds for biofuel production. *Bioresour. Technol.* 102, 35-42. doi: 10.1016/j.biortech.2010.06.158
- Passos, F., Hernández-Marín, M., García, J. & Ferrer, I. (2014). Long-term anaerobic digestion of microalgae grown in HRAP for wastewater treatment. Effect of microwave pretreatment. *Water Res.*, 49(1), 351–359. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2013.10.013>
- Pinheiro, L. A., Chinelatto, M. A. & Canevarolo, S. V. (2006). Evaluation of Philips and Ziegler–Natta high-density polyethylene degradation during processing in an internal mixer using the chain scission and branching distribution function analysis. *Polym. Degrad. Stab.* 91(10), 2324–2332. doi: 10.1016/j.polymdegradstab.2006.04.005
- PlasticsEurope, (2017). Plastics - the facts. Recuperado de: <http://www.plasticseurope.org/Document/plastics---the-facts-2016-15787.aspx?FolID=2>
- PlasticsEurope, (2016). Plastics - the facts. Recuperado de :

Estudio de la biodegradabilidad y ecotoxicidad de plásticos oxodegradables

<http://www.plasticseurope.org/Document/plastics---the-facts-2015.aspx>

- Polonini, H. C., Brandão, H. M., Raposo, N. R., Brandão, M. A. F., Mouton, L., Couté, A., ... & Brayner, R. (2015). Size-dependent ecotoxicity of barium titanate particles: the case of *Chlorella vulgaris* green algae. *Ecotoxicology*, 24(4), 938-948. doi: 10.1007/s10646-015-1436-6
- Porter, S. D. (2008). Algal attributes: An autecological classification of algal taxa collected by the National Water- Quality Assessment Program. (U. S. G. S. D. S. 329, Ed.). U.S. Geological Survey, Reston, Virginia. Recuperado de <http://pubs.usgs.gov/ds/ds329/>
- Portillo, F., Yashchuk, O., & Hermida, E. (2016). Evaluation of the rate of abiotic and biotic degradation of oxodegradable polyethylene. *Polym. Test.* 53, 58–69. doi:10.1016/j.polymertesting.2016.04.022
- Prin, J., Rojas, B., Tenia, R., Rivero, J. & Puig, C. (2011). Evaluación por MEB y MET mediante dos técnicas de teñido de la morfología de un polietileno de alta densidad. *Acta microsc* 1,3
- Ren, X. (2003). Biodegradable plastics: a solution or a challenge? *J. Clean. Prod*, 11(1), 27–40. [https://doi.org/http://dx.doi.org/10.1016/S0959-6526\(02\)00020-3](https://doi.org/http://dx.doi.org/10.1016/S0959-6526(02)00020-3)
- Reuschenbach, P., Pagga, U. & Strotmann, U. (2003). A critical comparison of respirometric biodegradation tests based on OECD 301 and related test methods. *Water research*, 37(7), 1571-1582. doi: 10.1016/S0043-1354(02)00528-6
- Rochman, C. M., Hoh, E., Hentschel, B. T. & Kaye, S. (2013). Long-term field measurement of sorption of organic contaminants to five types of plastic pellets: implications for plastic marine debris. *Environ. Sci. Technol.* 47, 1646–1654. doi: 10.1021/es303700s
- Roy, P.K., Surekha, P., Rajagopal, C. & Choudhary, V. (2006). Effect of cobalt carboxylates on the photo-oxidative degradation of low-density polyethylene. Part-I. *Polym. Degrad. Stab.* 91, 1980–1988. doi:10.1016/j.polymdegradstab.2006.02.007
- Roy, P. K., Surekha, P., Raman, R. & Rajagopal, C. (2009). Investigating the role of metal oxidation state on the degradation behaviour of LDPE. *Polym. Degrad. Stab.* 94, 1033–1039. doi:10.1016/j.polymdegradstab.2009.04.025
- Roy, P. K., Titus, S., Surekha, P., Tulsí, E., Deshmukh, C. & Rajagopal, C. (2008). Degradation of abiotically aged LDPE films containing pro-oxidant by bacterial consortium. *Polym. Degrad. Stab.* 93, 1917–1922. doi:10.1016/j.polymdegradstab.2008.07.016
- Rummel, C. D., Löder, M., Fricke, N. F., Lang, T., Griebeler, E. M., Janke, M. & Gerdt, G., (2016). Plastic ingestion by pelagic and demersal fish from the North Sea and Baltic Sea. *Mar Pollut Bull* 102, 134–141. doi: 10.1016/j.marpolbul.2015.11.043
- Salazar, G. & Sunagawa, S. (2017). Marine microbial diversity. *Curr. Biol*, 27(11), R489-R494. doi 10.1016/j.cub.2017.01.017
- Sánchez-Bayo, F., van den Brink, P.J., Mann, R. M., Belzunce, M. J., Borja, A., Breure, T., van Dam, J. W., Garmendia, J. M., Hanson, M. L., Hollander, A., Hylland, K., Jackson, C.R. Kröger, R., Liess, M., van de Meent, D., Moore, M.T., Mueller, J.F., Negri, A. P., Peijnenburg, WJGM., Rodríguez, J.R., Schäfer, R. B., Sibley, P. K., Solaun, O., Thompson, D. G., Uthicke, S., Vijver, M. G., Vethaak, A. D. & Zorita, I. (2011) *Ecological Impacts of Toxic Chemicals* Edited by: F Sánchez-Bayo, PJ van den Brink and RM Mann. IL, USA: Bentham Science Publishers Ltd. isbn:978-1-60805-121-2. doi: 10.2174/97816080512121110101
- Sánchez, D., Obando, P., Betancourt, J., Ibarra, K., Ríos, M., Cuadrado, Í., ... & Vivas Aguas, L. J. (2014). Red de vigilancia para la conservación y protección de las aguas marinas y costeras de C. (REDCAM). I. técnico 2013., 2014. Diagnóstico y Evaluación de la Calidad de las Aguas Marinas y Costeras del Caribe y Pacífico colombianos.

Estudio de la biodegradabilidad y ecotoxicidad de plásticos oxodegradables

- Seale, D. B., Boraas, M. E. & Warren, G. J. (s.f.). Effects of sodium and phosphate on growth of cyanobacteria. *Water Res*, 21, 625–631. doi: 10.1016/0043-1354(87)90072-8
- Setälä, O., Fleming-Lehtinen, V. & Lehtiniemi, M. (2014). Ingestion and transfer of microplastics in the planktonic food web. *Environ. Pollut.* 185, 77–83. doi: 10.1016/j.envpol.2013.10.013
- Shah, A. A., Hasan, F., Hameed, A. & Ahmed, S. (2008). Biological degradation of plastics: A comprehensive review. *Biotechnol. Adv.* 246–265. doi:10.1016/j.biotechadv.2007.12.005
- Sharabi, N. & Bartha, R. (1993). Testing of some assumptions about biodegradability in soil as measured by carbon dioxide evolution. *Appl Environ Microbiol*, 59(4), 1201-1205. doi: 0099-2240/93/041201-05\$02.00/
- Silva, A., Figueiredo, S., Sales, M. & Delerue-Matos, C. (2009). Ecotoxicity tests using the green algae *Chlorella vulgaris*—A useful tool in hazardous effluents management. *J. Hazard. Mater.* 167, 179–185. doi:10.1016/j.jhazmat.2008.12.102
- Singh, B., & Sharma, N. (2008). Mechanistic implications of plastic degradation. *Polym. Degrad. Stab.* 561–584. doi:10.1016/j.polymdegradstab.2007.11.008
- Slawomir, L. & Wilk-Wozniak, E. (2011). The occurrence of a *Euglena pascheri* and *Lepocinclis ovumbloom* in an oxbow lake in southern Poland under extreme environmental condition. *Ecol Indic* 11, 925–929. DOI: 10.1016/j.ecolind.2010.10.008
- Steer, M., Cole, M., Thompson, R. C. & Lindeque, P. K. (2017). Microplastic ingestion in fish larvae in the western English Channel. *Environ. Pollut.* 226, 250-259. doi: 10.1016/j.envpol.2017.03.062
- Sudhakar, M., Doble, M., Murthy, P. S. & Venkatesan, R. (2008). Marine microbe-mediated biodegradation of low- and high-density polyethylenes. *Int. Biodeter. Biodegr.* 61, 203–213. doi:10.1016/j.ibiod.2007.07.011
- Sudhakar, M., Trishul, A., Doble, M., Kumar, K., Jahan, S., Inbakandan, D., Viduthalai, R., Umadevi, V., Murthy, P. & Venkatesan, R. (2007). Biofouling and biodegradation of polyolefins in ocean waters. *Polym. Degrad. Stab.* 92, 1743–1752. doi: 10.1016/j.polymdegradstab.2007.03.029
- Swisher R. D. (1987). *Surfactant biodegradation*, 2nd ed. New York: Marcel Dekker Inc.
- Syberg, K., Khan, F. R., Selck, H., Palmqvist, A., Banta, G. T., Daley, J., Sano, L. & Duhaime, M. B. (2015). Microplastics: Addressing Ecological Risk Through Lessons Learned. *Environ Toxicol Chem.* 34 (5), 945-953. doi 10.1002/etc.2914
- Takeda, H. (1988). Classification of *Chlorella* strains by means of the sugar components of the cell wall. *Biochem. Syst. Ecol.* 16(4), 367–371. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/0305-1978\(88\)90027-0](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/0305-1978(88)90027-0)
- Talsness, C. E., Andrade, A. J. M., Kuriyama, S. N., Taylor, J. A. & vom Saal, F. S. 2009. Components of plastic: experimental studies in animals and relevance for human health. *Phil. Trans. R. Soc. B* 364, 2079 – 2096. doi:10.1098/rstb.2008.0281
- Tarazona, J. V., Sobanski, M. A., Cesnaitis, R., Sobanski, T., Bonnomet, V., Versonnen, B. & Coen, W. (2014). Analysis of the Ecotoxicity data submitted within the framework of the REACH Regulation. Part 2. Experimental aquatic toxicity assays. *Sci. Total Environ.*, 472, 137–145. doi: 10.1016/j.scitotenv.2013.10.073
- Teuten, E. L., Saquing, J. M., Knappe, D.R.U., Barlaz, M. A., Jonsson, S., Bjorn, A., Rowland, S. J., Thompson, R. C., Galloway, T. S., Yamashita, R., Ochi, D., Watanuki, Y., Moore, C., Pham, H. V., Tana, T. S., Prudente, M., Boonyatumanond, R., Zakaria, M. P., Akkhavong, K., Ogata, Y., Hirai, H., Iwasa, S., Mizukawa, K., Hagino, Y., Imamura, A., Saha, M. & Takada, H. (2009). Transport and release of chemicals from plastics to the environment and to wildlife. *Phil. Trans. R. Soc. B* 2027–2045. doi:10.1098/rstb.2008.0284

Estudio de la biodegradabilidad y ecotoxicidad de plásticos oxodegradables

- Thomas, N. L., Clarke, J., McLauchlin, A.R. & Patrick, S.G. (2012). Oxo-degradable plastics: degradation, environmental impact and recycling. *Proceedings of the Institution of Civil Engineers*, 165(3), 133-140. doi: 10.1680/warm.11.00014
- Thompson, R. C., Moore, C. J., vom Saal, F. S. & Swan, S. H. (2009a). Plastics, the environment and human health: current consensus and future trends. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.* 364, 2153–2166. doi:10.1098/rstb.2009.0053
- Thompson, R. C., Olsen, Y., Mitchell, R. P., Davis, A., Rowland, S. J., John, A.W.G., McGonigle, D. & Russell, A. E. (2004). Lost at Sea: Where is all the Plastic? *Science*, 304 (5672), 838–838. doi:10.1126/science.1094559
- Thompson, R. C., Swan, S.H., Moore, C. J. & von Saal, F. (2009b). Our plastic age. *Phil. Trans. R. Soc.B* 1973–1976. doi:10.1098/rstb.2009.0054
- Truhaut R. (1977). Ecotoxicology: objectives, principles and perspective. *Ecotoxicol Environ Saf.* 1(2), 151-73.
- Tyler, D. R. (2015). Metal–metal bond photochemistry as a tool for understanding the photochemical degradation of plastics. *Inorganica Chim. Acta* 424, 29–37. doi:10.1016/j.ica.2014.08.004
- Villalobos, A., Calderón, L., Figueroa, C., Fierro, J., Otálora, G. & Álvarez, R. (2007). Evaluación por método ecométrico de agar obtenido de algas rojas colombianas. *UNIVERSITAS SCIENTIARUM*, 12, 57–65.
- Wagner, M. & Oehalman J. (2009). Endocrine disruptors in bottled mineral water: total estrogenic burden and migration from plastic bottles. *Environ Sci Pollut Res Int.*16(3) 278-86. doi: 10.1007/s11356-009-0107-7.
- Walker, J. B. (1954). Inorganic micronutrient requirements of *Chlorella*. II. Quantitative requirements for iron, manganese, and zinc. *Arch. Biochem. Biophys.* 53(1), 1–8. doi: 10.1016/0003-9861(54)90227-1
- Wallace, H., Jan, A., Barregård, L., Bignami, M., Ceccatelli, S., Cottrill, B... & Hoogenboom, L. R. (2016). Presence of microplastics and nanoplastics in food, with particular focus on seafood. *EFSA J.* 14(6):4501. doi:10.2903/j.efsa.2016.4501
- Wang, Z., Zhang, H. & Pan, G. (2016). Ecotoxicological assessment of flocculant modified soil for lake restoration using an integrated biotic toxicity index. *Water research*, 97, 133-141. doi: 10.1016/j.watres.2015.08.033
- Wiles, D. & Scott, G. (2006). Polyolefins with controlled environmental degradability. *Polym. Degrad. Stab.* 1581–1592. doi:10.1016/j.polymdegradstab.2005.09.010
- Wright, S. L., Thompson, R. C. & Galloway, T. S. (2013). The physical impacts of microplastics on marine organism: A review. *Environ. Pollut.* 483–492. doi:10.1016/j.envpol.2013.02.031
- Yang, D., Shi, H., Li, L., Li, J., Jabeen, K. & Kolandhasamy, P. (2015). Microplastic pollution in table salts from China. *Environ. Sci. Technol.* 49(22), 13622-13627. doi: 10.1021/acs.est.5b03163
- Yashchuk, O., Portillo, F. S. & Hermida, E. B. (2012). Degradation of Polyethylene Film Samples Containing Oxo-Degradable Additives. *Procedia Materials Science*, 439–445. <https://doi.org/http://dx.doi.org/10.1016/j.mspro.2012.06.059>
- Zalasiewicz, J., Waters, C. N., Ivar do Sul, J., Corcoran, P. L., Barnosky, A. D., Cearreta, A., Edgeworth, M., Gałuszka, A., Jeandel, C., Leinfelder, R., McNeill, J. R., Steffen, W., Summerhayes, C., Wapre, M., Williams, M., Wolfe, A. P. & Yonah, Y. (2016). The geological cycle of plastics and their use as a stratigraphic indicator of the Anthropocene. *Anthropocene*. doi:10.1016/j.ancene.2016.01.002
- Zettler, E. R., Mincer, T. J. & Amaral-Zettler, L. A. (2013). Life in the "plastisphere": Microbial

Estudio de la biodegradabilidad y ecotoxicidad de plásticos oxodegradables

communities on plastic marine debris. *Environ. Sci. Technol.* 47, 7137–7146. doi:10.1021/es401288x

Zhao, S., Zhu, L. & Li, D. (2016). Microscopic anthropogenic litter in terrestrial birds from Shanghai, China: Not only plastics but also natural fibers. *Sci. Total Environ.* 550, (2016) 1110-1115. doi: 10.1016/j.scitotenv.2016.01.112

Zurita, J. L., Repetto, G., Jos, A., Del Peso, A., Salguero, M., López-Artíguez, M. & Cameán, A. (2005). Ecotoxicological evaluation of diethanolamine using a battery of microbiotests. *Toxicol In Vitro*, 19(7), 879-886. doi: 10.1016/j.tiv.2005.06.035

ANEXOS

ANEXO 1 Normalización de los datos materiales originales.

Residuos para los materiales originales, sin exposición.

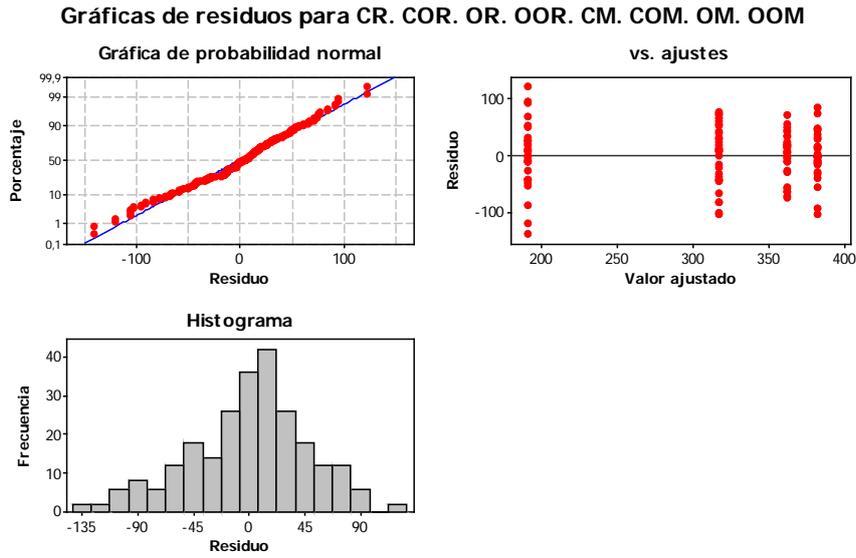


Figura A1. Gráfica de residuos para los materiales sin exposición.

ANEXO 2 Normalización de datos conjuntos mar-río para 180 de exposición.

Prueba de normalidad de AD para los datos de porcentaje de elongación a la ruptura expuestos 180 días en ambiente marino y de río.

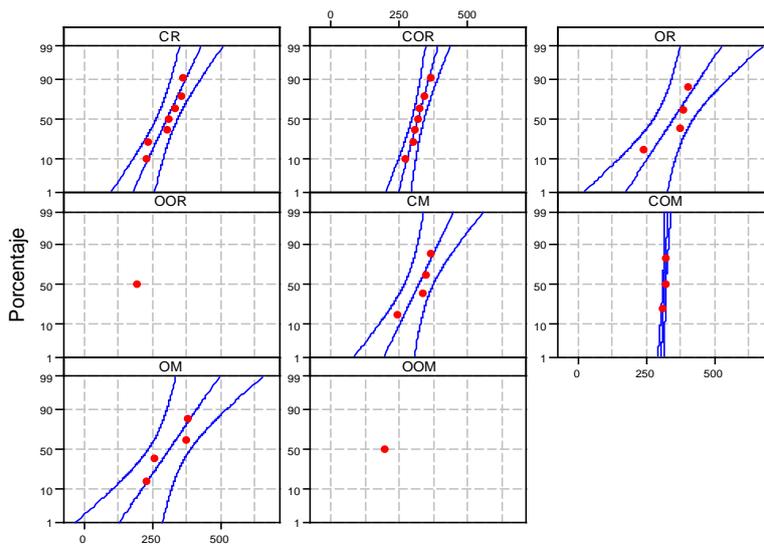


Figura A2-1. Representación de la prueba de normalidad para los datos de elongación para materiales expuestos en ambiente marino (M) y de Río (R): PEAD convencional (C); PEAD convencional fotooxidado (CO); PEAD oxodegradable (OR); PEAD oxodegradable fotooxidado (OO), expuestos 180 días.

Se muestran los residuos de datos de porcentaje de elongación para tratamiento desde el inicio hasta final del periodo de exposición. Ambiente mar (Figura A2-2) y ambiente fluvial (Anexo 5).

Estudio de la biodegradabilidad y ecotoxicidad de plásticos oxodegradables

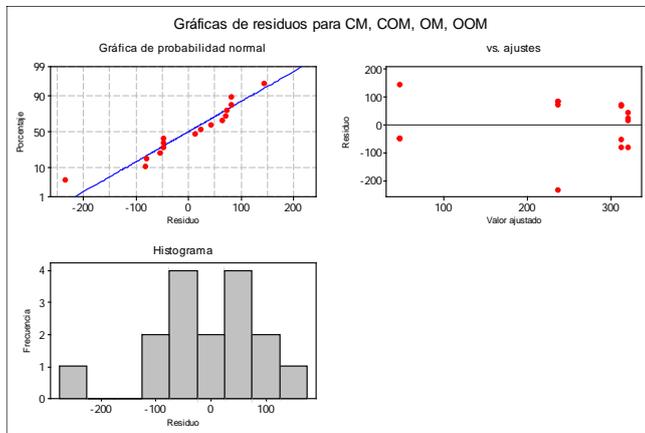


Figura A2-2. Residuos para los datos de elongación para materiales expuestos 180 días en ambiente marino (M): PEAD convencional (C); PEAD convencional fotooxidado (CO); PEAD oxodegradable (OR); PEAD oxodegradable fotooxidado (OO).

ANEXO 3 Estadística de datos para plásticos expuestos en el mar 60 días.

Tabla A3-1 ANOVA unidireccional: CM. COM. OM (60 días)

Fuente	GL	SC	MC	F	P
Factor	2	32917	16459	7,45	0,001
Error	51	112600	2208		
Total	53	145517			

PRUEBA DE TUKEY para CM, COM, OM (60 DÍAS)

S = 46,99 R-cuad. = 22,62% R-cuad.(ajustado) = 19,59%

ICs de 95% individuales para la media basados en Desv.Est. agrupada

Nivel	N	Media	Desv.Est.	-----+-----+-----+-----+
CM	23	332,79	44,13	(-----*-----)
COM	23	308,53	52,20	(-----*-----)
OM	8	258,71	37,41	(-----*-----)

-----+-----+-----+-----+

245 280 315 350

Desv.Est. agrupada = 46,99
Intervalos de confianza simultáneos de Tukey del 95%
Todas las comparaciones en parejas

Nivel de confianza individual = 98,05%
Se restó CM a:

	Inferior	Centro	Superior	+-----+-----+-----+-----+
COM	-57,67	-24,26	9,15	(-----*-----)
OM	-120,58	-74,07	-27,57	(-----*-----)

-----+-----+-----+-----+

-120 -60 0 60

Se restó COM a:

	Inferior	Centro	Superior	+-----+-----+-----+-----+
OM	-96,32	-49,82	-3,31	(-----*-----)

-----+-----+-----+-----+

-120 -60 0 60

Intervalos de confianza individuales de Fisher del 95%
Todas las comparaciones en parejas

Nivel de confianza simultánea = 87,93%

Se restó CM a:

	Inferior	Centro	Superior	-----+-----+-----+-----+
COM	-52,07	-24,26	3,56	(-----*-----)
OM	-112,79	-74,07	-35,35	(-----*-----)

-----+-----+-----+-----+

-60 0 60 120

Se restó COM a:

	Inferior	Centro	Superior	-----+-----+-----+-----+
OM	-88,54	-49,82	-11,10	(-----*-----)

-----+-----+-----+-----+

-60 0 60 120

ANEXO 3

Gráficas de residuos para CM. COM. OM (60 días)

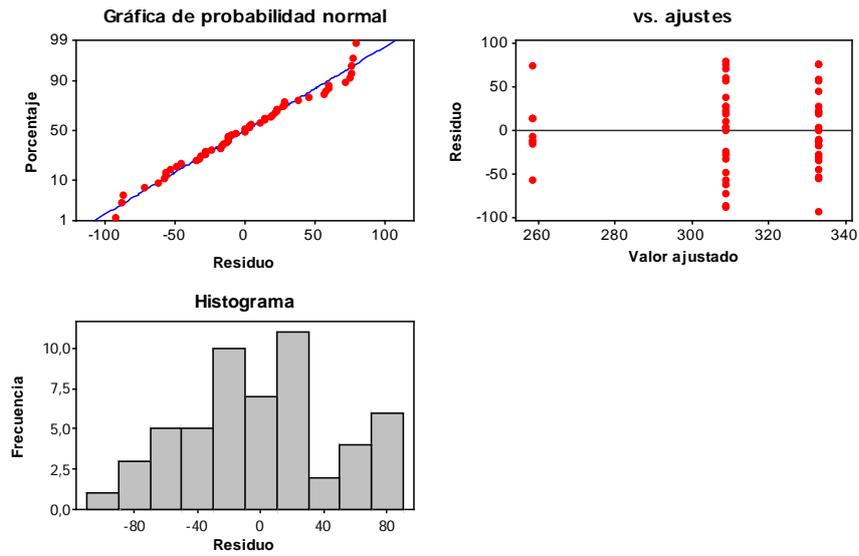


Figura A3B-1. Residuos para los datos de materiales expuestos en ambiente marino, durante 60 días PEAD convencional, COM: PEAD convencional fotooxidado, OM: PEAD oxodegradable, OOM: PEAD oxodegradable fotooxidado.

ANEXO 4

Características de los microorganismos presentes en probetas expuestas en el mar.

Características morfológicas sobresalientes de los microorganismos cultivados en agar marino encontradas en las probetas de plásticos expuestos en el mar.

Tabla A4. Características morfológicas de microorganismos encontrados en probetas expuestas en el mar.

Muestra	Tamaño	Forma	Elevación	color
Convencional	Grande	Circular	Convexa	Amarillo
	Puntiforme	Irregular	Plana	Naranja
Convencional	Grande	Circular	Convexa	Salmón
Oxodegradable	Grande	Circular	Plana	Amarillo
	Grande	Circular	Plana	Negro
Oxodegradable	Grande	Circular	Plana	Amarillo
fotooxidado	Grande	Circular	Plana	Blanca
	Puntiforme	Irregular	Plana	Amarilla
Convencional	Grande	Circular	Plana	Amarillo
fotooxidado	Grande	Circular	Plana	Negra
	Mediana	Circular	Plana	Amarilla
Agua marina	Grande	Circular	Convexa	Salmón

ANEXO 5 A. Estadísticas para materiales expuestos en río.

Tabla A5-1 ANOVA unidireccional de PEAD expuestos 180 días en el río: CR. COR. OR. OOR.

Fuente	GL	SC	MC	F	P
Factor	3	21048	7016	3,31	0,049
Error	15	31748	2117		
Total	18	52795			

S = 46,01 R-cuad. = 39,87% R-cuad.(ajustado) = 27,84%

PRUEBA DE TUKEY

ICs de 95% individuales para la media basados en Desv.Est. agrupada

Nivel	N	Media	Desv.Est.	
CR	7	309,71	47,37	(---*---)
COR	7	315,71	31,58	(---*---)
OR	4	352,00	64,04	(---*---)
OOR	1	191,00	*	(-----*-----)

-----+-----+-----+-----+
160 240 320 400

Desv.Est. agrupada = 46,01

Intervalos de confianza simultáneos de Tukey del 95%
Todas las comparaciones en parejas

Nivel de confianza individual = 98,87%

Se restó CR a:

	Inferior	Centro	Superior	
COR	-64,94	6,00	76,94	(---*---)
OR	-40,90	42,29	125,48	(---*---)
OOR	-260,60	-118,71	23,18	(-----*-----)

-----+-----+-----+-----+
-160 0 160 320

Se restó COR a:

	Inferior	Centro	Superior	
OR	-46,90	36,29	119,48	(---*---)
OOR	-266,60	-124,71	17,18	(-----*-----)

-----+-----+-----+-----+
-160 0 160 320

Representación gráfica de la prueba de Tukey

Estudio de la biodegradabilidad y ecotoxicidad de plásticos oxodegradables

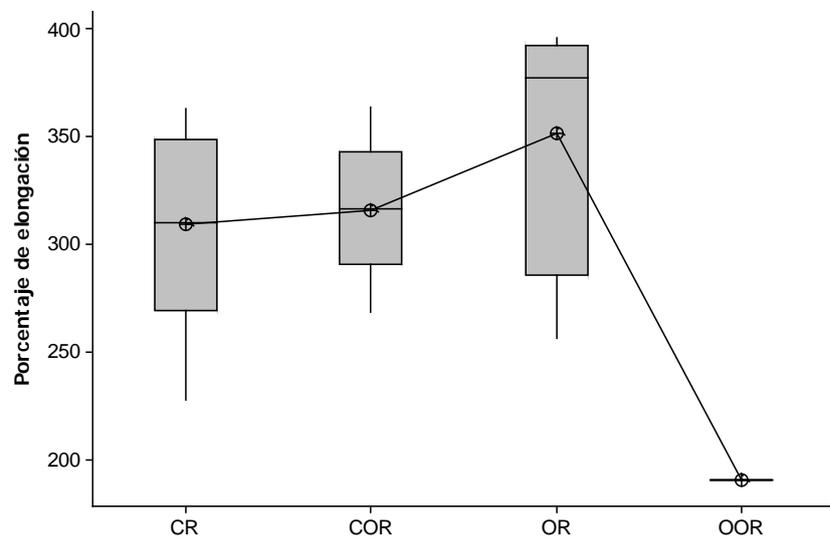


Figura A5A-1. Diagrama de caja y bigotes para los materiales expuestos en el río 180 días.

ANEXO 5B

Análisis de residuos para los valores de elongación a la ruptura de CR, COR, OR, OOR (180 días).

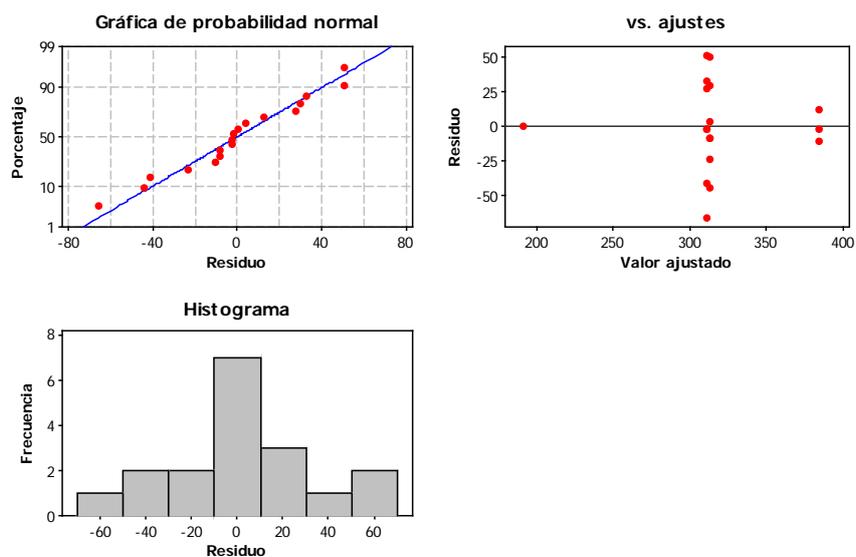
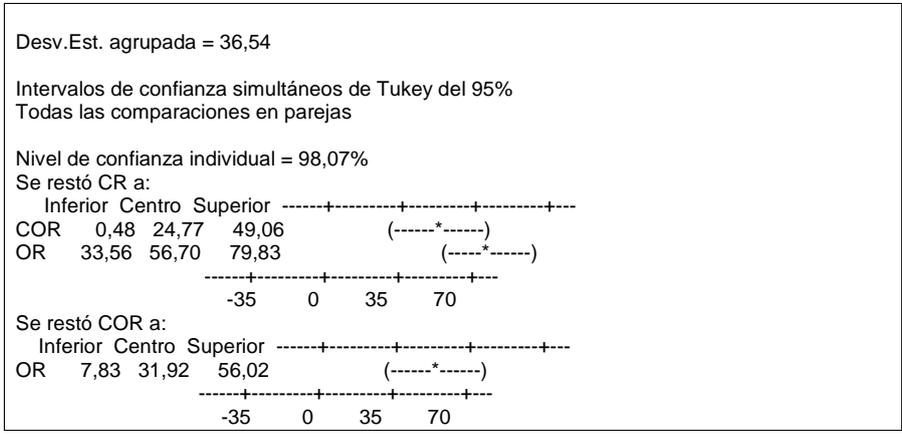


Figura A5B-1. Análisis de residuos para los valores de elongación a la ruptura de CR, COR, OR, OOR (180 días de exposición).

Estudio de la biodegradabilidad y ecotoxicidad de plásticos oxodegradables



La figura A6-2 muestra los residuos de los datos de elongación a la ruptura para los PEAD expuestos 30 días en ambiente fluvial.

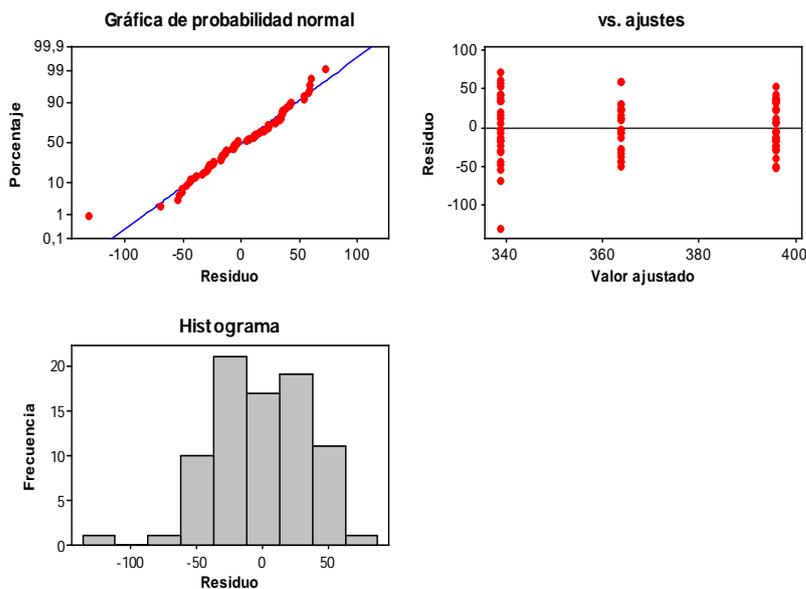


Figura A6-2. Residuos para los datos de elongación para materiales expuestos en ambiente Río (R): PEAD convencional (C); PEAD convencional fotooxidado (CO); PEAD oxodegradable (OR); PEAD oxodegradable fotooxidado (OO), expuestos 30 días.

b. 90 días

Estudio de la biodegradabilidad y ecotoxicidad de plásticos oxodegradables

Tabla A6-2 ANOVA Unidireccional para 90 días de materiales expuestos en el río.

Fuente	GL	SC	MC	F	P
Factor	2	17255	8628	6,11	0,005
Error	39	55029	1411		
Total	41	72284			

S = 37,56 R-cuad. = 23,87% R-cuad.(ajustado) = 19,97%

ICs de 95% individuales para la media
basados en Desv.Est. agrupada

Nivel	N	Media	Desv.Est.	
CR	22	309,18	43,44	(---*---)
COR	17	319,53	28,95	(----*---)
OR	3	237,37	31,57	(-----*-----)

Desv.Est. agrupada = 37,56

Intervalos de confianza simultáneos de Tukey del 95%
Todas las comparaciones en parejas

Nivel de confianza individual = 98,06%

Se restó CR a:

	Inferior	Centro	Superior	
COR	-19,24	10,35	39,94	(--*---)
OR	-128,21	-71,82	-15,42	(-----*-----)

Se restó COR a:

	Inferior	Centro	Superior	
OR	-139,55	-82,16	-24,78	(-----*-----)

Gráficas de residuos para CR. COR. OR

Estudio de la biodegradabilidad y ecotoxicidad de plásticos oxodegradables

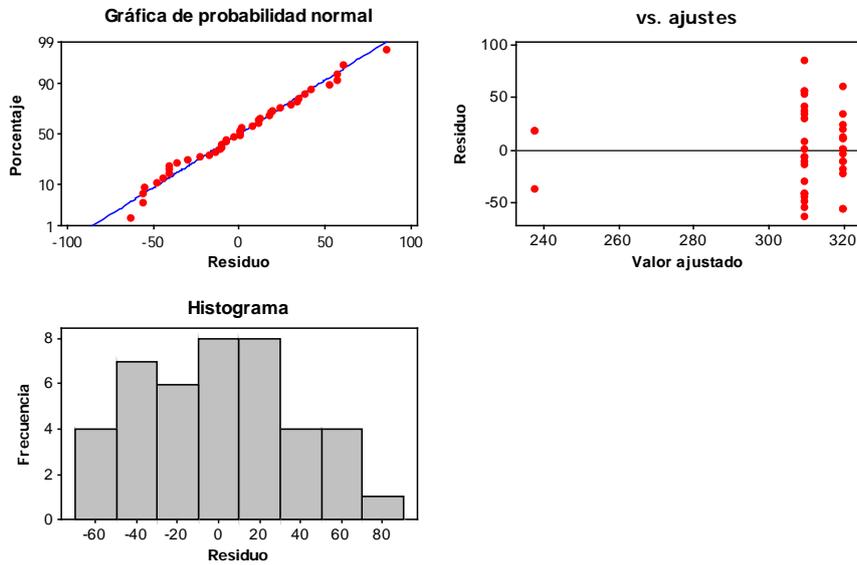


Figura A6-3. Residuos para los datos de elongación para materiales expuestos en ambiente Río (R): PEAD convencional (C); PEAD convencional fotooxidado (CO); PEAD oxodegradable (OR); PEAD oxodegradable fotooxidado (OO), expuestos 90 días.

c. 180 días

Tabla A6-3 ANOVA unidireccional: CR. COR (180 DÍAS)

Fuente	GL	SC	MC	F	P
Factor	1	12391	12391	6,96	0,013
Error	30	53388	1780		
Total	31	65779			

S = 42,19 R-cuad. = 18,84% R-cuad.(ajustado) = 16,13%

ICs de 95% individuales para la media basados en Desv.Est. agrupada

Nivel	N	Media	Desv.Est.	Intervalo
CR	12	228,36	54,60	(-----*-----)
COR	20	269,01	32,93	(-----*-----)

Desv.Est. agrupada = 42,19

Estudio de la biodegradabilidad y ecotoxicidad de plásticos oxodegradables

Prueba de Normalidad

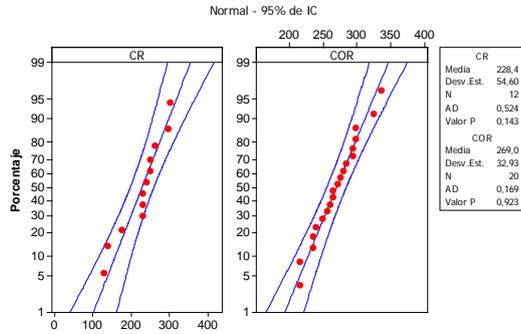


Figura A6-4. Representación de la prueba de normalidad para los datos de elongación de plásticos expuestos 180 días en ambiente Río (R): PEAD convencional (C); PEAD convencional fotooxidado (CO); PEAD oxodegradable (OR); PEAD oxodegradable fotooxidado (OO), expuestos.

RESIDUOS PARA 180 DÍAS RIO

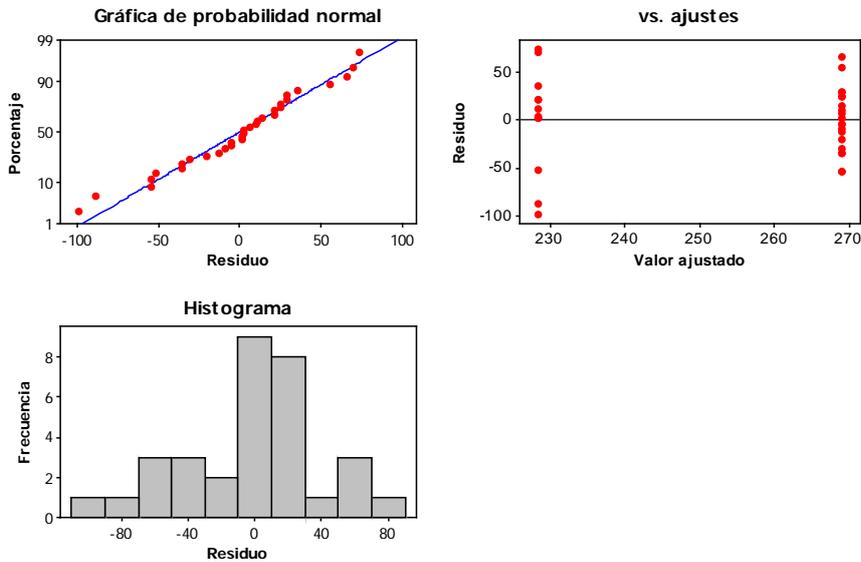


Figura A6-5. Residuos para los datos de elongación para materiales expuestos en ambiente Río (R): PEAD convencional (C); PEAD convencional fotooxidado (CO); PEAD oxodegradable (OR); PEAD oxodegradable fotooxidado (OO), expuestos 180 días.

Estudio de la biodegradabilidad y ecotoxicidad de plásticos oxodegradables

ANEXO 7 Características de los microorganismos encontrados en probetas expuestas en el río.

Características morfológicas sobresalientes de los microorganismos cultivados en agar Sabouraud BD procedentes de las probetas de plásticos expuestos en el río.

Tabla A7 Características morfológicas de microorganismos encontrados en probetas expuestas en el río.

Muestra	Tamaño	Forma	Superficie	Color
Agua	Pequeño	Redonda	Lisa	Blanco
PEAD Convencional	Grande	Redonda	Algodonosa	Amarilla
	Mediana	Redonda	Filamentosa	Negra(blanco)
	Puntiforme	Redonda	Lisa	Blanca(café)
PEAD oxodegradable	Mediana	Redonda	Filamentosa	Negro(blanco)
	Mediana	Redonda	Lisa	Blanca
	Puntiforme	Redonda	Lisa	Blanca
PEAD convencional fotooxidado	Grandes	Redonda	Algodonosa	Blanca
	Mediana	Redonda	Rugosa	Blanco(negro)
	Puntiforme	Redonda	Lisa	Blanca
PEAD oxodegradable fotooxidado				

ANEXO 8 Densidad óptica en pruebas de ecotoxicidad.

Valores de densidad óptica por triplicado para cada plástico.

Los datos de la tabla A8-1 de este anexo representan los valores de densidad óptica para los diferentes tratamientos de la microalga a una concentración de 1000 mg.L⁻¹. La columna 1 de la tabla A8-1, corresponde a los días de exposición y las demás columnas corresponden a los valores de absorbancia para cada situación de estrés.

Tabla A8-1. Valores de densidad óptica durante todo el periodo de crecimiento de *Chlorella* sp, con tres réplicas para cada experimento. Testigo (B), PEAD Convencional (C), PEAD Oxodegradable (O), PEAD Oxodegradable fotooxidado (OO).

Días	B 1	B 2	B 3	C 1	C 2	C 3	O 1	O 2	O 3	OO 1	OO 2	OO 3
0	0,010	0,010	0,010	0,010	0,010	0,010	0,010	0,010	0,010	0,010	0,010	0,010
1	0,026	0,026	0,026	0,026	0,026	0,026	0,026	0,026	0,026	0,026	0,026	0,026
2	0,038	0,033	0,048	0,054	0,036	0,044	0,035	0,045	0,038	0,036	0,045	0,04
3	0,048	0,066	0,073	0,08	0,081	0,096	0,088	0,079	0,076	0,081	0,088	0,094
4	0,114	0,107	0,118	0,126	0,145	0,214	0,16	0,14	0,156	0,168	0,158	0,193
6	0,125	0,125	0,17	0,149	0,194	0,387	0,173	0,191	0,136	0,172	0,151	0,222
7	0,127	0,231	0,273	0,262	0,426	0,542	0,357	0,354	0,337	0,337	0,329	0,425
8	0,303	0,378	0,493	0,404	0,568	0,538	0,51	0,575	0,446	0,559	0,452	0,676
9	0,458	0,536	0,639	0,589	0,795	0,473	0,721	0,746	0,684	0,605	0,644	0,842
10	0,588	0,605	0,89	0,72	1,026	0,474	0,893	0,85	0,837	0,825	0,819	0,962
11	0,682	0,607	0,978	0,751	1,115	0,513	0,991	0,957	0,907	0,96	0,904	1,083
14	0,768	0,675	1,081	1,022	1,273	0,598	0,9	1,085	1,104	1,134	1,071	1,262
16	1,027	0,968	1,215	1,251	1,47	0,632	1,278	1,241	1,241	0,915	1,308	1,559
17	1,097	0,812	1,306	1,292	1,536	0,553	1,374	1,327	1,39	0,737	1,372	1,523

En las tablas de la A8-2 a la A8-5, se muestra el ANOVA para cada uno de los tratamientos: Testigo (B), y PEAD Convencional (C), PEAD Oxodegradable (O), Oxodegradable fotooxidado (OO), respectivamente.

Tabla A8-2. ANOVA y prueba de comparaciones de Tukey tratamiento B.

ANOVA - Tratamiento B				
Fuente	GL	SC	MC	P
Factor	2	0,212	0,106	0,66
Error	36	5,779	0,161	
Total	38	5,992		
S = 0,4007 R-cuad. = 3,54% R-cuad.(ajustado) = 0,00%				
Comparación de Tukey- tratamiento B				
ICs de 95% individuales para la media basados en Desv. Est agrupada				

Estudio de la biodegradabilidad y ecotoxicidad de plásticos oxodegradables

Nivel	N	Media	Desv.Est.	-----+-----+-----+-----+
B 1	13	0,4155	0,3836	(-----*-----)
B 2	13	0,3976	0,3225	(-----*-----)
B 3	13	0,5623	0,4801	(-----*-----)
				-----+-----+-----+-----+
				0,32 0,48 0,64 0,80
Desv.Est. agrupada = 0,4007				

Tabla A8-3 ANOVA y prueba de comparaciones de Tukey tratamiento PEAD convencional

ANOVA - Tratamiento Convencional					
Fuente	GL	SC	MC	F	P
Factor	2	0,500	0,250	1,30	0,284
Error	36	6,910	0,192		
Total	38	7,410			
S = 0,4381 R-cuad. = 6,75% R-cuad.(ajustado) = 1,57%					
Comparación de Tukey- tratamiento N					
ICs de 95% individuales para la media basados en Desv.Est agrupada					
Nivel	N	Media	Desv.Est.	-----+-----+-----+-----+	
N1	13	0,5174	0,4572	(-----*-----)	
N2	13	0,6685	0,5649	(-----*-----)	
N3	13	0,3915	0,2183	(-----*-----)	
				-----+-----+-----+-----+	
				0,20 0,40 0,60 0,80	
Desv.Est. agrupada = 0,4381					

Tabla A8-4. ANOVA y prueba de comparaciones de Tukey tratamiento PEAD oxodegradable (O).

ANOVA - Tratamiento Oxodegradable					
Fuente	GL	SC	MC	F	P
Factor	2	0,002	0,001	0,00	0,995
Error	36	8,340	0,232		
Total	38	8,342			
S = 0,4813 R-cuad. = 0,03% R-cuad.(ajustado) = 0,00%					
Comparación de Tukey- tratamiento O					
ICs de 95% individuales para la media basados en Desv.Est. agrupada					
Nivel	N	Media	Desv.Est.	+-----+-----+-----+-----	
O 1	13	0,5774	0,4787	(-----*-----)	
O 2	13	0,5858	0,4772	(-----*-----)	
O 3	13	0,5675	0,4880	(-----*-----)	

Estudio de la biodegradabilidad y ecotoxicidad de plásticos oxodegradables

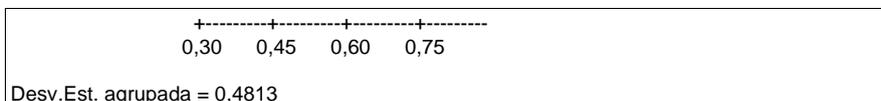


Tabla A8-5. ANOVA y prueba de comparaciones de Tukey tratamiento PEAD OO.

ANOVA - Tratamiento Oxodegradable Fotooxidado				
Fuente	GL	SC	MC	F P
Factor	2	0,220	0,110	0,47 0,630
Error	36	8,443	0,235	
Total	38	8,663		
S = 0,4843 R-cuad. = 2,53% R-cuad.(ajustado) = 0,00%				
Comparación de Tukey- tratamiento OO				
ICs de 95% individuales para la media basados en Desv. Est. agrupada				
Nivel	N	Media	Desv.Est.	-----+-----+-----+-----+-
OO 1	13	0,5042	0,3896	(-----*-----)
OO 2	13	0,5667	0,4864	(-----*-----)
OO 3	13	0,6852	0,5614	(-----*-----)
				-----+-----+-----+-----+-
				0,40 0,60 0,80 1,00
Desv.Est. agrupada = 0,4843				

Valores promedio de densidad óptica para cada tratamiento de plástico.

Tabla A8-6. Valores promedio de los tratamientos empleados para el crecimiento de la biomasa en términos de densidad óptica para dispersiones de los plásticos de 1000 mgL⁻¹.

Período de crecimiento (días)	BP	CP	OP	OOP
0	0,010±0,000	0,010±0,000	0,010±0,000	0,010±0,000
1	0,026±0,000	0,026±0,000	0,026±0,000	0,026±0,000
2	0,04±0,008	0,045±0,009	0,039±0,005	0,04±0,006
3	0,062±0,013	0,086±0,009	0,081±0,008	0,088±0,009
4	0,113±0,006	0,162±0,0046	0,152±0,038	0,173±0,038
6	0,14±0,026	0,243±0,126	0,167±0,118	0,182±0,012
7	0,21±0,075	0,41±0,141	0,349±0,093	0,364±0,108
8	0,391±0,096	0,503±0,087	0,510±0,029	0,562±0,033
9	0,544±0,091	0,619±0,163	0,717±0,016	0,697±0,151
10	0,694±0,170	0,74±0,177	0,860±0,028	0,869±0,231
11	0,756±0,170	0,793±0,303	0,952±0,318	0,982±0,267
14	0,841±0,213	0,964±0,341	1,030±0,0338	1,156±0,246

Estudio de la biodegradabilidad y ecotoxicidad de plásticos oxodegradables

La figura A8-2, muestra los valores de densidad óptica promedio durante todo el periodo de crecimiento de *Chlorella* sp, con tres réplicas para cada experimento, para cada dispersión de plásticos.

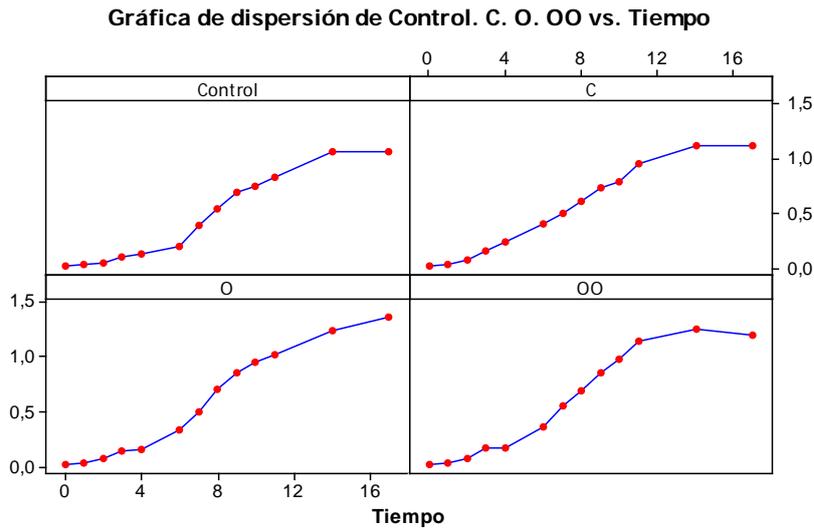


Figura A8-1. Valores de densidad óptica durante todo el periodo de crecimiento de *Chlorella* sp, con tres réplicas para cada experimento. Donde: Testigo (B), PEAD Convencional (C), PEAD Oxodegradable (O), PEAD Oxodegradable fotooxidado (OO).

La figura A8-2 muestra los residuos de los datos de densidad óptica de las pruebas de toxicidad par aos plásticos ensayados.

Estudio de la biodegradabilidad y ecotoxicidad de plásticos oxodegradables

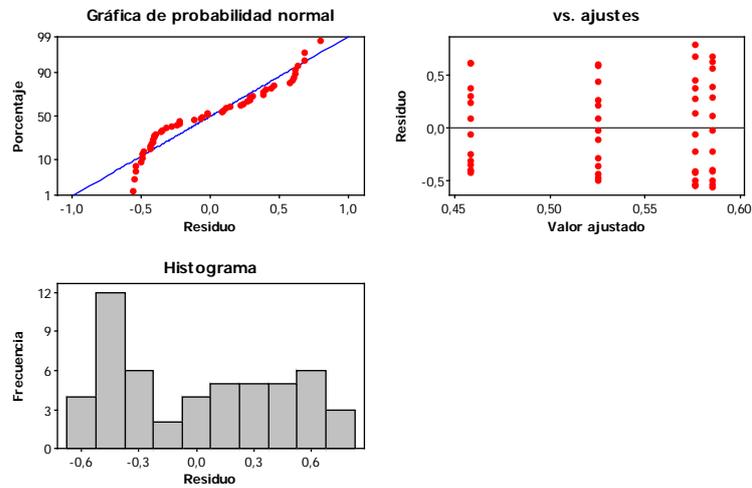


Figura A8-2. Valores de densidad óptica durante todo el periodo de crecimiento de *Chlorella* sp, con tres réplicas para cada experimento. Donde: Testigo (B), PEAD Convencional (C), PEAD Oxodegradable (O), PEAD Oxodegradable fotooxidado (OO).

ANEXO 9. Fotomicrografías de materiales expuestos en mar y río.

Micrografías de los materiales expuestos en el mar.

En las figuras de la A9-1 a la A9-4, se muestran las micrografías de los materiales expuestos en medio marino.

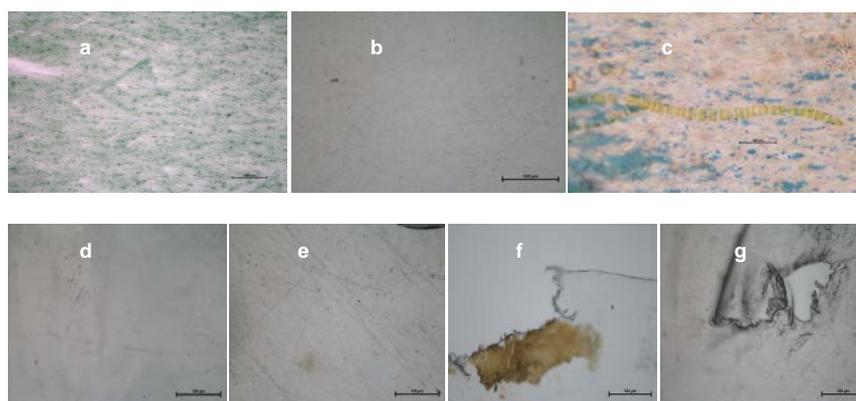


Figura A9-1. Fotomicrografía de PEAD convencional: (a) sin exposición; expuesto en medio marino, (b) 30 días, (c) 60 días, (d) 90 días, (e) 120 días, (f) 150 días, (g) 180 días.

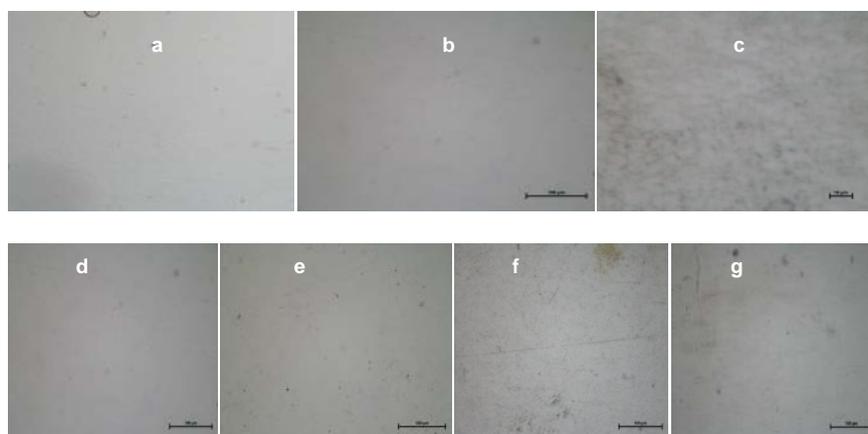


Figura A9-2. Fotomicrografía de PEAD convencional fotooxidado: (a) sin exposición; expuesto en medio marino, (b) 30 días, (c) 60 días, (d) 90 días, (e) 120 días, (f) 150 días, (g) 180 días.

Estudio de la biodegradabilidad y ecotoxicidad de plásticos oxodegradables

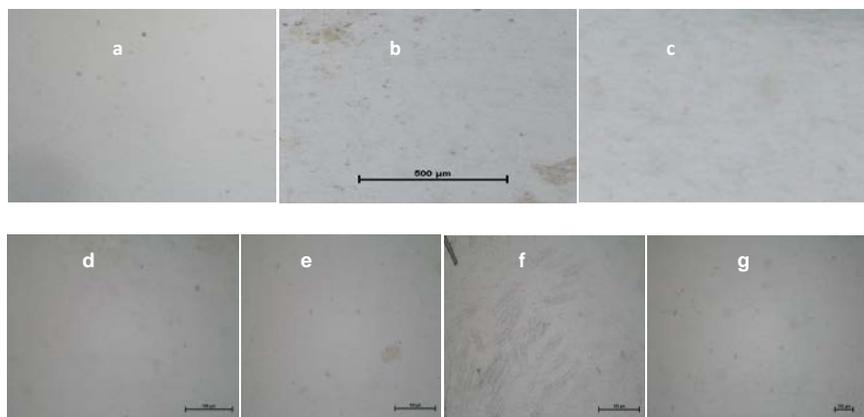


Figura A9-3. Fotomicrografía de PEAD oxodegradable: (a) sin exposición; expuesto en medio marino, (b) 30 días, (c) 60 días, (d) 90 días, (e) 120 días, (f) 150 días, (g) 180 días.

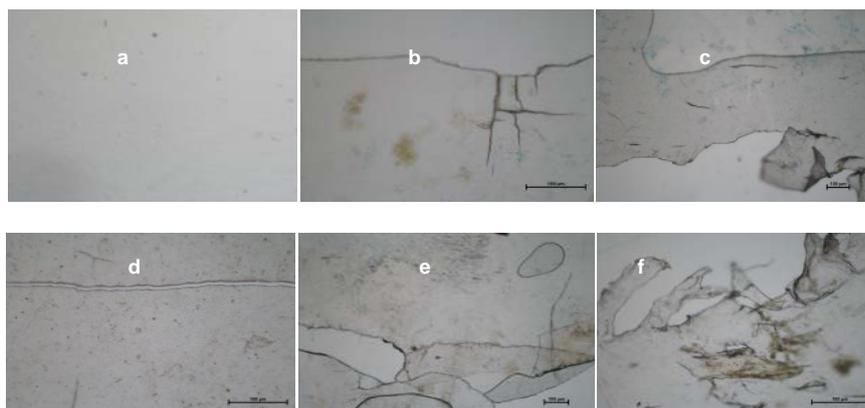


Figura A9-4. Fotomicrografía de PEAD oxodegradable fotooxidado: (a) sin exposición; expuesto en medio marino, (b) 30 días, (c) 60 días, (d) 90 días, (e) 120 días, (f) 150 días.

Micrografías de los materiales expuestos en el río.

En las figuras de la A9-5 a la A9-8, se muestran las micrografías de los materiales expuestos en el río.

Estudio de la biodegradabilidad y ecotoxicidad de plásticos oxodegradables

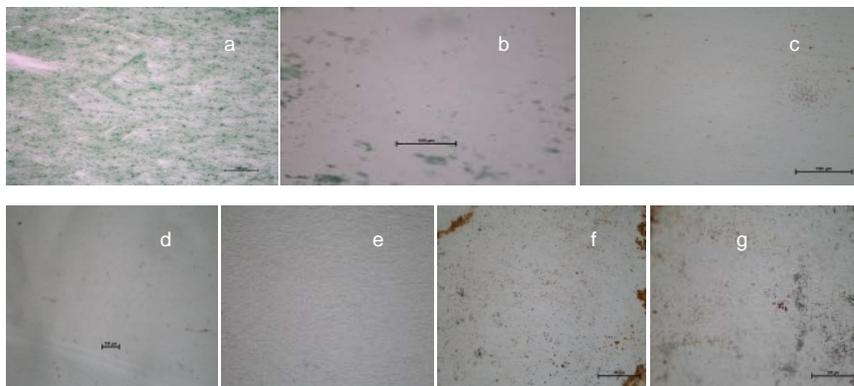


Figura A9-5. Fotomicrografía de PEAD convencional: (a) sin exposición; expuesto en medio agua dulce: (b) 30 días, (c) 60 días, (d) 90 días, (e) 120 días, (f) 150 días, (g) 180 días.

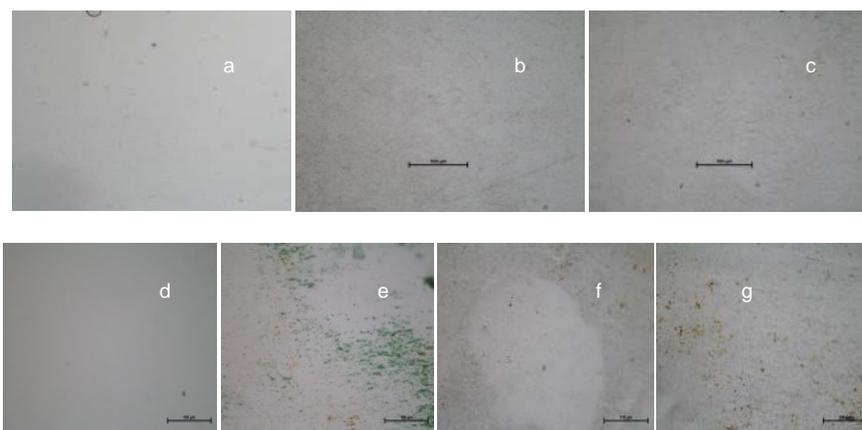


Figura A9-6. Fotomicrografía de PEAD convencional fotooxidado: (a) sin exposición; expuesto en medio de agua dulce: (b) 30 días, (c) 60 días, (d) 90 días, (e) 120 días, (f) 150 días, (g) 180 días.

Estudio de la biodegradabilidad y ecotoxicidad de plásticos oxodegradables

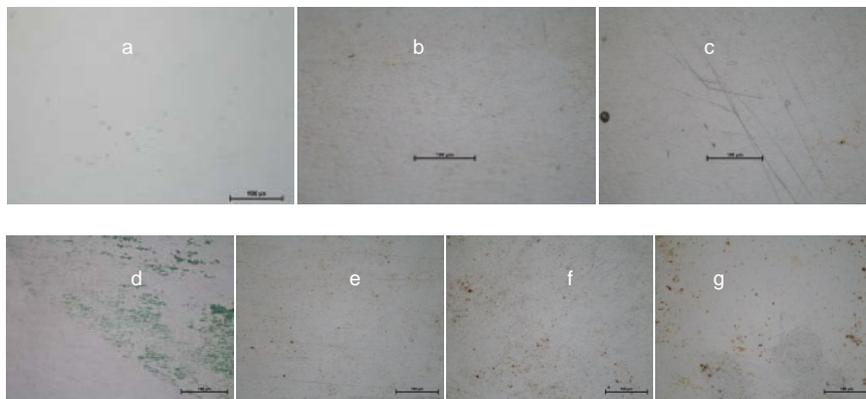


Figura A9-7. Fotomicrografía de PEAD oxodegradable: (a) sin exposición; expuesto en medio agua dulce: (b) 30 días, (c) 60 días, (d) 90 días, (e) 120 días, (f) 150 días, (g) 180 días.

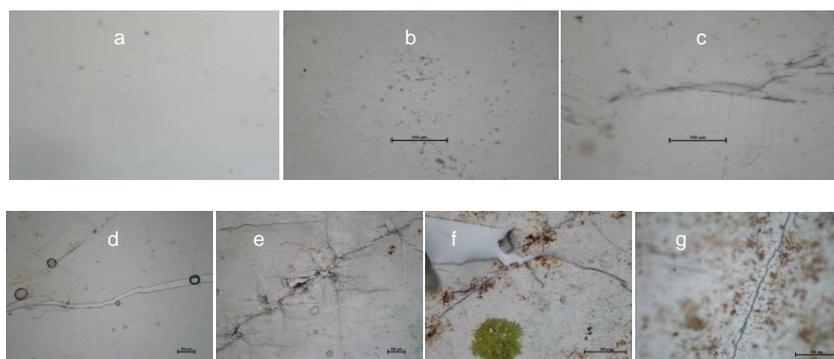


Figura A9-8. Fotomicrografía de PEAD oxodegradable fotooxidado: (a) sin exposición; expuesto en medio agua dulce: (b) 30 días, (c) 60 días, (d) 90 días, (e) 120 días, (f) 150 días, (g) 180 días.