

EVALUACIÓN DE LA BIODEGRADACIÓN MICROBIANA DE UN EMPAQUE
PLÁSTICO COMERCIAL DE ÁCIDO POLILÁCTICO POR MEDIO DE UN LODO
ACTIVO, *ASPERGILLUS* Y LODO ACTIVO BIOAUMENTADO CON
ASPERGILLUS EN UN MEDIO ACUOSO AEROBIO

HAYDER LEANDRO MOGOLLÓN MERCHÁN
LAURA DANIELA SARMIENTO TRUJILLO

FUNDACIÓN UNIVERSIDAD DE AMÉRICA
FACULTAD DE INGENIERÍAS
PROGRAMA DE INGENIERÍA QUÍMICA
BOGOTÁ
2020

EVALUACIÓN DE LA BIODEGRADACIÓN MICROBIANA DE UN EMPAQUE
PLÁSTICO COMERCIAL DE ÁCIDO POLILÁCTICO POR MEDIO DE UN LODO
ACTIVO, *ASPERGILLUS* Y LODO ACTIVO BIOAUMENTADO CON
ASPERGILLUS EN UN MEDIO ACUOSO AEROBIO.

HAYDER LEANDRO MOGOLLÓN MERCHÁN
LAURA DANIELA SARMIENTO TRUJILLO

Proyecto integral de grado para optar por el título de
INGENIERO QUÍMICO

Director
Diana Milena Morales Fonseca
M. Sc. Microbióloga

Codirector
Néstor Ariel Algecira Enciso
M. Sc. Ingeniero Químico

FUNDACIÓN UNIVERSIDAD DE AMÉRICA
FACULTAD DE INGENIERÍAS
PROGRAMA DE INGENIERÍA QUÍMICA
BOGOTÁ
2020

Nota de aceptación

Microbióloga Adriana Inés Páez Morales

Ing. Nelson Fernández Barrero

Bogotá D.C., Febrero de 2020

DIRECTIVOS DE LA UNIVERSIDAD

Presidente Institucional y Rector del Claustro

Dr. Mario Posada García Peña

Vicerrector de Desarrollo y Recursos Humanos

Dr. Luis Jaime Posada García Peña

Vicerrectora Académica y de Posgrados (E)

Dra. Alexandra Mejía Guzmán

Secretaria General

Dra. Alexandra Mejía Guzmán

Decano Facultad de Ingenierías

Dr. Julio César Fuentes Arismendi

Director del Programa de Ingeniería Química

Ing. Leonardo de Jesús Herrera Gutiérrez

Las directivas de la Universidad de América, los jurados calificadores y el cuerpo docente no son responsables por los criterios e ideas expuestas en el presente documento. Estos corresponden únicamente a los autores.

DEDICATORIA

“El doble pensar está arraigado en el corazón mismo del Ingsoc, ya que el acto esencial del Partido es el engaño consciente, conservando a la vez la firmeza de propósito que caracteriza a la auténtica honradez. Decir mentiras a la vez que se cree sinceramente en ellas, olvidar todo hecho que no convenga recordar, y luego, cuando vuelva a ser necesario, sacarlo del olvido sólo por el tiempo que convenga, negar la existencia de la realidad objetiva sin dejar ni por un momento de saber que existe esa realidad que se niega...todo esto es indispensable”

George Orwell

Dedico este trabajo a mi madre Luz Merchán por siempre creer en mí, a mi padre Luis Mogollón por apoyarme. A mi hermano Ludwig por sus consejos desde la experiencia. A aquellos cronopios, famas y esperanzas que han celebrado las diferencias y buscan un mundo en el que quepan muchos mundos.

Hayder Leandro Mogollón Merchan

Con amor y cariño dedico este logro profesional a:
Mis padres, Lucila y Henry, por brindarme su apoyo, gracias por sus actos sinceros que me ayudaron a cumplir este logro de la mejor manera posible.
Mi hermana Mónica, siendo emprendedora me ha mostrado un modelo a seguir, gracias por brindarme ayuda incondicional en el desarrollo de este proyecto de grado y vida.
Mi hermana Camila, por ser un ejemplo de fortaleza para culminar este logro profesional.
Mis amistades cercanas, por estar a lo largo de este aprendizaje siendo mutuamente un complemento para cumplir este objetivo.
Finalmente, me dedico este logro profesional a mí.

Laura Daniela Sarmiento Trujillo

AGRADECIMIENTO

Los autores expresan sus más sinceros agradecimientos a:

Microbióloga Diana Milena Morales Fonseca, directora del proyecto, por brindarnos su conocimiento, su experiencia como guía y apoyo constante en el desarrollo y culminación de este mismo.

Ingeniero Químico Néstor Ariel Algecira Enciso, codirector del proyecto, por su apoyo y confianza en la realización del proyecto, brindando su dedicación y conocimiento para obtener los mejores resultados.

Ricardo Cortés Segura y personal de laboratorio de la Universidad Nacional de Colombia sede Bogotá, por su ayuda en el desarrollo de la técnica.

INDICE DE CONTENIDOS

	pág.
INTRODUCCIÓN	21
OBJETIVOS	23
1. MARCO TEÓRICO	24
1.1 MATERIALES PLÁSTICOS	24
1.1.1 Bioplasticos	24
1.1.2 Ácido poliláctico (PLA)	25
1.1.3 Polietileno (PE)	31
1.1.4 Celulosa	32
1.2 DEGRADACIÓN	33
1.2.1 Degradación química	33
1.2.1.1 Oxidación	33
1.2.1.2 Hidrólisis	33
1.2.2 Termodegradación	34
1.2.3 Degradación por radiación	34
1.2.3.1 Fotodegradación (radiación UV)	34
1.2.3.2 Degradación por radiaciones de alta energía	35
1.2.4 Degradación mecánica	35
1.2.5 Biodegradación	35
1.2.5.1 Degradación aerobia	36
1.3 MEDIOS DEGRADATIVOS	37
1.3.2 Lodo activado	38
1.3.3 Bioaumentación	38
1.4 CARACTERIZACIÓN DE MATERIALES	38
1.4.1 Electroscopio de transmisión de infrarrojo por transformada de Fourier	39
1.4.2 Microscopia electrónica de barrido (SEM)	39
1.5 ESTANDARES PARA LA EVALUACIÓN AMBIENTAL DE LOS PLÁSTICOS	39
1.5.1 EN 13432:2000	39
1.5.2 ISO 14851:2019	40
1.5.3 ISO 14852:2018	40
1.5.4 ISO 14855:2018	40
1.5.5 ASTM D6400-04	40
1.5.6 ASTM D5247-92	41
2. DESARROLLO EXPERIMENTAL	42
2.1 DESCRIPCIÓN DEL PROCESO	42
2.1.1 Distribución de los biorreactores	43
2.2 CARACTERÍSTICAS DE LOS REACTIVOS Y PREPARACIÓN	45
2.2.1 Preparación solución hidróxido de bario Ba (OH) ₂	45
2.2.2 Preparación solución ácido clorhídrico HCl	45

2.3 CARACTERÍSTICAS Y PREPARACIÓN DE LOS INÓCULOS	45
2.3.1 Preparación de los inóculos	46
2.3.1.1 Preparación del inóculo de <i>A. brasiliensis</i>	46
2.3.2 Preparación del inóculo de lodo activo	49
2.3.3 Preparación del inóculo de lodo activo bioaumentado un 10% con <i>A. brasiliensis</i>	50
2.4 CARACTERÍSTICAS Y PREPARACIÓN DE MATERIAL DE ENSAYO	50
2.5 PREPARACIÓN DE MUESTRAS PARA LOS BIORREACTORES	51
2.5.1 Muestra de blanco (inóculo solo)	51
2.5.2 Muestra celulosa (control positivo)	51
2.5.3 Muestra HDPE (control negativo)	51
2.5.4 Muestra PLA	51
2.6 VARIABLES DEL PROCESO	51
2.6.1 Temperatura	51
2.6.2 pH	52
2.6.3 Flujo de aire	52
2.6.4 Concentración lodo activado	52
2.6.5 Concentración <i>A. brasiliensis</i>	52
3. ANÁLISIS Y RESULTADOS	53
3.1 CANTIDAD DE DIÓXIDO DE CARBONO	53
3.2 PORCENTAJE DE BIODEGRADACIÓN	55
3.2.1 Carbono orgánico total (TOC)	55
3.2.2 Cantidad teórica de carbono generado	55
3.3 PÉRDIDA DE MASA DE MATERIAL DE ENSAYO	61
3.4 ELECTROSCOPIO DE TRANSMISIÓN DE INFRARROJO POR TRANSFORMADA DE FOURIER (FTIR)	62
3.5 MICROSCOPIA ELECTRÓNICA DE BARRIDO (SEM)	67
3.6 VALIDACIÓN DE RESULTADOS	70
4. CONCLUSIONES	71
5. RECOMENDACIONES	72
BIBLIOGRAFÍA	
ANEXOS	738

LISTA DE DIAGRAMAS

	pág.
Diagrama 1. Procedimiento para el desarrollo técnica de biodegradación	44
Diagrama 2. Recuento del cultivo de <i>A. brasiliensis</i>	47
Diagrama 3. Acondicionamiento final para el inóculo <i>A. brasiliensis</i>	49
Diagrama 4. Determinación de sólidos secos de lodo activo	49
Diagrama 5. Acondicionamiento final del lodo activo	50

LISTA DE ECUACIONES

	pág.
Ecuación 1. Reacción en medio aerobio	36
Ecuación 2. Reacción en medio anaerobio	36
Ecuación 3. Concentración de esporas	48
Ecuación 4. Reacción en la solución de hidróxido de bario (trampa de CO ₂)	53
Ecuación 5. Reacción en la titulación con ácido clorhídrico y fenolftaleína	53
Ecuación 6. mmoles de Hidróxido de Bario en el proceso de titulación	54
Ecuación 7. mmoles iniciales hidróxido de bario.	54
Ecuación 8. mmoles iniciales de hidróxido de bario	54
Ecuación 9. Gramos de dióxido de carbono	54
Ecuación 10. Porcentaje de biodegradación	55
Ecuación 11. Cantidad teórica de carbono generado	56

LISTA DE FIGURAS

	pág.
Figura 1. Clasificación de polímeros biodegradables según su origen	25
Figura 2. Monómero del PLA	26
Figura 3. Hidrólisis enzimática del almidón	27
Figura 4. Ruta metabólica de la fermentación ácido láctica para la producción de ácido láctico	28
Figura 5. Principales procesos de síntesis de PLA	30
Figura 6. Obtención del polietileno (PE)	31
Figura 7. Monómero de la celulosa	32
Figura 8. Vista superior, red de equipos para proceso de biodegradación	43

LISTA DE GRÁFICAS

pág.

Gráfica 1. Porcentaje de biodegradación en el inóculo de <i>A. brasiliensis</i>	57
Gráfica 2. Porcentaje de biodegradación en el inóculo de lodo activo	57
Gráfica 3. Porcentaje de biodegradación en el inóculo de lodo activo bioaumentado un 10% con <i>A. brasiliensis</i>	58
Gráfica 4. Porcentaje de biodegradación del PLA en los inóculos de <i>A. brasiliensis</i> , lodo activo y lodo activo bioaumentado un 10% con <i>A. brasiliensis</i>	59
Gráfica 5. FTIR referencia del PLA	63
Gráfica 6. FTIR del PLA en el inóculo de <i>A. brasiliensis</i>	63
Gráfica 7. FTIR del PLA en el inóculo de lodo activo	64
Gráfica 8. FTIR del PLA en el inóculo de lodo activo bioaumentado un 10% con <i>A. brasiliensis</i>	64

LISTA DE TABLAS

	pág.
Tabla 1. Distribución de los biorreactores dentro de la nevera	43
Tabla 2. Características de reactivos implementados	45
Tabla 3. Características de los inóculos	46
Tabla 4. Recuento celular del cultivo <i>A. brasiliensis</i> (esporas)	48
Tabla 5. Características de los materiales a evaluar	50
Tabla 6. Carbono orgánico total para los materiales de ensayo	55
Tabla 7. Cantidad teórica de carbono generado por el material de ensayo.	56
Tabla 8. Porcentaje de pérdida de masa de las muestras	61
Tabla 9. Datos del FTIR del ácido poliláctico (PLA) de referencia	65
Tabla 10. Datos del FTIR del PLA en los tres tipos de inóculo	66

LISTA DE ANEXOS

	pág.
Anexo A. Especificación de equipos y materiales usados en la técnica	79
Anexo B. Preparación solución hidróxido de bario	82
Anexo C. Preparación solución ácido clorhídrico	83
Anexo D. Protocolo para recuperación cepa liofilizada <i>A. brasiliensis</i>	84
Anexo E. Titulación de la solución hidróxido de bario por inóculos	85
Anexo F. Porcentajes de biodegradación del PLA con análisis estadístico	95
Anexo G. Dióxido de carbono generado con análisis estadístico	97
Anexo H. Porcentajes de biodegradación	99
Anexo I. Caracterización lodo activo	100
Anexo J. Concentración mínima inhibitoria para <i>A. brasiliensis</i>	101
Anexo K. Masa inicial y final de las muestras	102

LISTA DE ABREVIACIONES

CMI: concentración mínima inhibitoria

FTIR: electroscopio de transmisión de infrarrojo por transformada de Fourier

HDPE: polietileno de alta densidad

ISO: International Organization for Standardization

PLA: ácido poliláctico

SEM: microscopía electrónica de barrido

ThCO₂: cantidad teórica de carbono generado

TOC: carbono orgánico total

GLOSARIO

BIODEGRADACIÓN AERÓBICA: descomposición de un compuesto orgánico por microorganismos en presencia de oxígeno en la cual se libera energía, dióxido de carbono y sales minerales, es la de mayor rendimiento energético.

BIODEGRADACIÓN: es el resultado de los procesos de digestión, asimilación y metabolización de un compuesto orgánico llevado a cabo por bacterias hongos, protozoos y otros organismos.

BIOPLÁSTICO (BPL): materiales plásticos fabricados a partir de materiales orgánicos siendo biodegradables.

RESPIROMETRÍA: técnica basada en la medición del consumo de oxígeno o producción de dióxido de carbono por parte de microorganismos que están en presencia de sustrato orgánico.

LIOFILIZACIÓN: proceso que tiene como objetivo separar el agua de una disolución mediante congelación y posterior sublimación del hielo. Proceso más suave para secar productos alimenticios, compuestos orgánicos o inorgánicos sin alterar composición cualitativa y cuantitativa.

CÁMARA DE NEUBAUER: instrumento utilizado para determinar el número de partículas por unidad de volumen de un líquido, partículas como leucocitos, eritrocitos, trombocitos, bacterias, esporas etc. se cuentan visualmente con un microscopio.

CABINA DE FLUJO LAMINAR: son zonas libres de partículas contaminantes, que permiten trabajar con esterilidad y asepsia. Por medio de un filtro de HEPA o ULPA da un tratamiento específico al aire.

RESUMEN

El presente trabajo de grado nace al reconocer el inminente uso de nuevas alternativas como los bioplásticos frente a los plásticos de uso único, alternativa cada vez más aceptada en la sociedad, pues se está generando conciencia de la actual problemática ambiental, la acumulación de este residuo sólido. Por lo tanto, se genera la necesidad de validar la función de biodegradación de estos materiales plásticos etiquetados en el mercado como biodegradable. Por medio de la presente investigación experimental se quiere suplir esa necesidad valorando un empaque plástico comercial de ácido poliláctico (PLA), teniendo como control negativo polietileno de alta densidad (HDPE) y como control positivo celulosa, por medio del desarrollo de una técnica experimental en el cual hace parte tres tipos de inóculos, *Aspergillus brasiliensis*, lodo activo y por último lodo activo bioaumentado un 10% con *A. brasiliensis*, este último para generar una comparación de resultados directa con el lodo activo.

El proceso de biodegradación debido a que se encuentra en condiciones aerobias y acuoso tiene como guía la norma ISO 14852:2018 titulada “Determinación de la biodegradación aeróbica completa de materiales plásticos en un medio acuoso por el método de análisis de dióxido de carbono liberado”, la implementación de esta técnica establece parámetros como temperatura, flujo y calidad de aire, y concentración de cada uno de los diferentes inóculos.

La biodegradación microbiana es evaluada mediante el porcentaje de biodegradación por la generación de dióxido de carbono durante 27 días y como análisis alternos, pérdida de masa, FTIR y SEM. Se obtuvo resultados coherentes entre las cuatro pruebas anteriormente nombradas, el empaque de PLA demuestra ser biodegradable, siendo así los resultados confiables para la comparación entre el desempeño de los inóculos.

Se determinó que no es una buena opción como inóculo un microorganismo en específico como el *A. brasiliensis*, se requiere múltiples microorganismos como los presentes en el lodo activo para un mejor desempeño como inóculo en el proceso de biodegradación del PLA.

PALABRAS CLAVE: Biodegradación, aeróbico, acuoso, ácido poliláctico, respirometría.

ABSTRACT

The present degree work is born by recognizing the imminent use of new alternatives such as bioplastics compared to single-use plastics, an increasingly accepted alternative in society, as awareness of the current environmental problem is being generated, the accumulation of this waste solid. Therefore, the need to validate the biodegradation function of these plastic materials labeled on the market as biodegradable is generated. By means of the present experimental research, we want to supply this need valuing a commercial plastic packaging of polylactic acid (PLA), having as a negative control high density polyethylene (HDPE) and as a positive cellulose control, through the development of an experimental technique in the which is part of three types of inoculum, *Aspergillus brasiliensis*, active sludge and finally 10% bio-increased active sludge with *A. brasiliensis*, the latter to generate a direct result comparison with the active sludge.

The biodegradation process because it is in aerobic and aqueous conditions is guided by ISO 14852: 2018 entitled "Determination of the complete aerobic biodegradation of plastic materials in an aqueous medium by the carbon dioxide analysis method released", The implementation of this technique determines parameters such as temperature, flow and air quality and concentration of each of the different inoculums.

Microbial biodegradation is evaluated by the percentage of biodegradation by the generation of carbon dioxide for 27 days and as alternate analyzes, mass loss, FTIR and SEM. Consistent results were obtained among the four tests previously mentioned, the PLA packaging proves to be biodegradable, thus being the reliable results for the comparison between the performance of the inoculums.

It was determined that a specific microorganism such as *A. brasiliensis* is not a good option as inoculum, multiple microorganisms such as those present in the active sludge are required for better performance as inoculum in the biodegradation process of PLA.

KEY WORDS: Biodegradation, aerobic, aqueous, polylactic acid, respirometry.

INTRODUCCIÓN

Los materiales poliméricos son de gran importancia pues en diferentes industrias tienen una amplia participación principalmente por su bajo costo, buenas propiedades y fácil moldeabilidad. Esa versatilidad les faculta para estar involucrados en construcción, transporte, agricultura, medicina y sobre todo en los alimentos; donde tienen presencia alrededor de toda la cadena de producción.

De esta manera, los envases alimentarios cumplen funciones muy importantes para la conservación de los alimentos, los protegen de agentes externos previniendo la contaminación física, química y/o microbiológica, así como también de su posible adulteración. Así, cumplen la función de barrera contra el medioambiente que los rodea, protegiendo los alimentos de la humedad y oxidación. También los envases cumplen una función informativa muy importante para el consumidor como son los datos nutricionales, fecha preferente de consumo o de caducidad y el modo de conservación de los alimentos que contienen. Además, pueden contener información del material del que está fabricado el envase, su reciclabilidad y donde debe ser desechado el envase una vez que ha cumplido su vida útil¹.

El sector de empaques o envases en Colombia representa el 55% de la demanda de la industria de los plásticos, donde los polímeros más utilizados son el polietileno (PE), poliestireno (PS), polipropileno (PP) y polietilentereftalato (PET). Debido a la corta vida útil de estos productos y las altas tasas de producción, los desechos generados representan cantidades alarmantes de contaminantes². “Tan solo en Bogotá se desecha un estimado de 428 toneladas anuales, y este material puede tardar entre 100 y 1000 años para degradarse, por lo que su acumulación genera graves problemas”³.

¹ ARRIETA, Marina. Films de PLA y PLA-PHB plastificados para su aplicación en envases de alimentos. Caracterización y análisis de los procesos de degradación [En línea] Madrid: Universidad politécnica de Valencia, 2014. 354 p

² RODRÍGUEZ CLAROS, Mónica. Efectos de la modificación de almidón de yuca y su mezcla con poli (Ácido láctico) (PLA) sobre su biodegradación [En línea] Universidad de los Andes, 2012. 52 p

³ TÉLLEZ MALDONADO, Alejandra. La complejidad de la problemática ambiental de los residuos plásticos: una aproximación al análisis narrativo de política pública en Bogotá [En línea] Universidad Nacional de Colombia, 2012. 120 p.

Dentro de las formas comunes de eliminación de residuos plásticos está la pirolisis, método que “permite disminuir el volumen de los desechos tratados hasta en un 90% y aprovechar la energía que se genera con la combustión de los residuos para recuperarla en forma de agua caliente, vapor o electricidad. Sin embargo, esta valorización energética puede generar algunas emisiones tóxicas”⁴

De forma alternativa y como respuesta a la tendencia de la sociedad contemporánea que se muestra más amable por el bienestar del ambiente. Se ha potenciado el desarrollo de biopolímeros producidos a partir de materia agrícola renovable, capaces de degradarse mediante factores bióticos por la acción de microorganismos que a determinadas condiciones descomponen la materia gracias a la manifestación de enzimas especializadas. Generando agua, biomasa y dióxido de carbono si se trata de una operación aerobia.

“La biodegradación de los plásticos permite la eliminación segura de estos materiales, y la verificación de su biodegradabilidad es esencial para no generar contaminación al ambiente”⁵. También como forma de seguimiento a los productos que ofrecen las industrias que aparentemente muestran un compromiso con el sostenimiento ambiental y que realmente tienen por objetivo alcanzar sus intereses económicos al hacerse acreedores de incentivos, que otorgan los gobiernos en sus diferentes políticas para mostrarse proactivos con el ambiente, con publicidad y promesas de un producto falaz que no goza del todo de las propiedades anunciadas, esto finaliza en un engaño al público.

Es latente la posibilidad de presencia de productos engañosos y, en consecuencia, persistirá la problemática de la acumulación de los residuos sólidos. Por lo anterior, en la presente investigación se evalúa la biodegradación aerobia de un empaque comercial de ácido poliláctico (PLA) por respirometría bajo los parámetros establecidos por la norma ISO 14852:2018, sometido a la acción de los medios acuosos lodo activado, *A. brasiliensis*, y bioaumentado de lodo activado con *A. brasiliensis* durante un periodo de 28 días. Además, se valoraron los cambios microestructurales y morfológicos del empaque al finalizar el proceso de biodegradación.

⁴ AURAS, R. HARTE, B. SELKE, S. An overview of polylactides as packaging materials. *Macromolecular Bioscience*. 2004;4(9):835-864. citado por ARRIETA, Marina. Films de PLA y PLA-PHB plastificados para su aplicación en envases de alimentos. Caracterización y análisis de los procesos de degradación.

⁵ PALECHOR, Jhon. Biodegradación aerobia bajo condiciones controladas de compostaje de una película flexible y una bandeja semirrígida obtenidas a partir de almidón y harina de yuca [En línea] Universidad Nacional de Colombia, 2017.

OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL

Evaluar la biodegradación microbiana de un empaque plástico comercial de ácido poliláctico por medio de un Lodo activo, *Aspergillus* y Lodo activo bioaumentado con *Aspergillus* en un medio acuoso aerobio.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Seleccionar los parámetros adecuados para la biodegradación de un empaque plástico comercial de ácido poliláctico por medio de Lodo activo, *Aspergillus* y Lodo activo bioaumentado con *Aspergillus* en un medio acuoso aerobio.
- Determinar la biodegradación de un empaque plástico comercial de ácido poliláctico por medio de un Lodo activo, *Aspergillus* y Lodo activo bioaumentado con *Aspergillus* en un medio acuoso aerobio por desarrollo experimental.
- Comparar el desempeño de un Lodo activo, *Aspergillus* y Lodo activo bioaumentado con *Aspergillus* en un proceso de biodegradación de un empaque plástico comercial de ácido poliláctico.

1. MARCO TEÓRICO

1.1 MATERIALES PLÁSTICOS

El plástico es un material de origen orgánico, está compuesto por largas cadenas de moléculas de gran tamaño denominadas polímeros, se obtienen artificialmente a partir de recursos naturales como el petróleo, carbón, gas natural, materias vegetales⁶. Algunas de las propiedades de estos materiales que los han hecho tan ampliamente usados son: la facilidad con que pueden ser moldeados, su impermeabilidad, su baja densidad, su baja conductividad eléctrica, su resistencia a la corrosión, su resistencia a diversos factores químicos, biológicos y su bajo costo⁷.

1.1.1 Bioplásticos. Los bioplásticos son plásticos biobasados, que significa que tienen un origen natural renovable u origen "bio" debido a que provienen de las plantas, animales y/o microorganismos, es decir no son basados en el petróleo⁸. Difiere entonces de un polímero biodegradable el cual tiene la capacidad de descomponerse en moléculas simples como consecuencia de la acción de microorganismos. Es la estructura química lo que hace a un polímero biodegradable y lo diferencia de un polímero convencional, esto permite que pueda ser degradado por microorganismos, como hongos y bacterias en ambientes biológicamente activos⁹. En la Figura 1 se muestra la clasificación de estos según su origen.

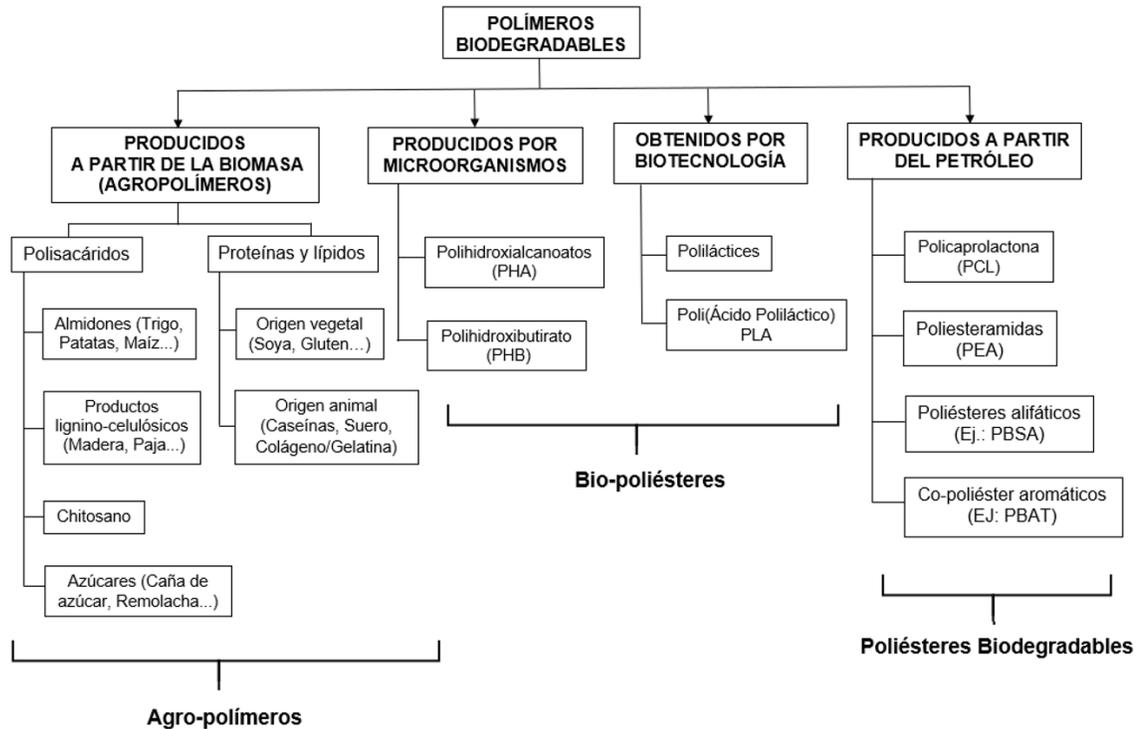
⁶ "Plástico". En: *Significados.com*. [En línea]. [revisado 18 de abril de 2019]. Disponible en internet: <https://www.significados.com/plastico/>

⁷ SEGURA, D. y NOGUEZ, R. y ESPÍN, G. Contaminación ambiental y bacterias productoras de plásticos biodegradables. *Biotecnología*.14: 361-372, 2007

⁸ ARRIETA, Marina. Films de PLA y PLA-PHB plastificados para su aplicación en envases de alimentos. Caracterización y análisis de los procesos de degradación [En línea] Madrid: UNIVERSIDAD POLITÉCNICA DE VALENCIA, 2014. 354 p

⁹ RODRÍGUEZ, Ariel. Biodegradabilidad de materiales bioplásticos. *Ciencia y Tecnología de los Alimentos*. 2012, vol. 22

Figura 1. Clasificación de polímeros biodegradables según su origen ¹⁰

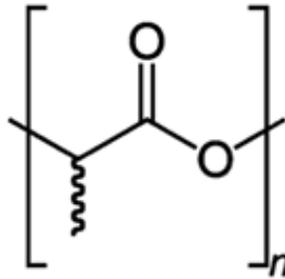


Fuente. AVEROUS, Luc. Biodegradable multiphase systems based on plasticized starch: A review. *Journal of Macromolecular Science-Polymer Reviews*. 2004;C44(3):231-274

1.1.2 Ácido poliláctico (PLA). Es un poliéster termoplástico cuya molécula precursora es el ácido láctico (Figura 2), la cual proviene de la fermentación de productos agrícolas simples almidón de maíz y celulosa. El PLA tiene propiedades mecánicas en el mismo rango de los polímeros petroquímicos, a excepción de una baja elongación, puede ser tan duro como el acrílico o tan blando como el polietileno, rígido como el poliestireno o flexible como un elastómero.

¹⁰ Adaptado de. AVEROUS, Luc. Biodegradable multiphase systems based on plasticized starch: A review. *Journal of Macromolecular Science-Polymer Reviews*. 2004;C44(3):231-274.

Figura 2.
Monómero del PLA



Fuente. Ácido poliláctico (PLA). [En línea]. (Nov 29). Disponible en: <https://www.textoscientificos.com/polimeros/acido-polilactico>

El PLA no puede ser sintetizado por polimerización directa del ácido láctico, porque cada reacción de polimerización genera una molécula de agua, que degrada la cadena de polímero formada a cadenas de baja masa molar¹¹.

La producción por biotecnología está basada en la fermentación de sustratos ricos en carbohidratos, generalmente se usa almidón, por microorganismos¹². Una ventaja de este proceso es la posibilidad de utilizar una gran variedad de sustratos orgánicos ricos en carbohidratos como melazas, suero de leche, almidón¹³. El proceso inicia con la descomposición del carbohidrato mediante una hidrólisis enzimática. El almidón se puede degradar con el empleo de enzimas del tipo

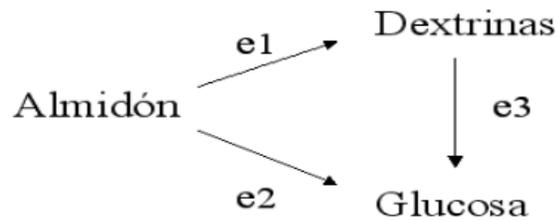
¹¹ KOLLER, M. SALERNO, A. DIAS, M. REITERER, A. BRAUNEGG, G. Modern Biotechnological Polymer Synthesis: A Review. *Food Technology and Biotechnology*. 2010;48(3):255-269. citado por ARRIETA, Marina. Films de PLA y PLA-PHB plastificados para su aplicación en envases de alimentos. Caracterización y análisis de los procesos de degradación.

¹² SERNA, Liliana; RODRÍGUEZ, Aida y ALBAN, Fred. Ácido poliláctico : Propiedades y Aplicaciones. *Ingeniería y Competividad*. 2003, vol. 5, nro. 1. pp. 16

¹³ OROZCO OLIVARES, Fatima. Producción de ácido láctico por medio de fermentación anaerobia y su polimerización a partir de reacciones de apertura de anillo [En línea] Mérida: centro de investigación científica de yucatán, A. C., 2011. 31 p

endoamilasas (α -amilasa), exoamilasas (glucoamilasa), enzimas desramificadoras y transferasas¹⁴ de acuerdo con la Figura 3.

Figura 3. Hidrólisis enzimática del almidón



e1 = α -amilasa

e2 = e3 = glucoamilasa

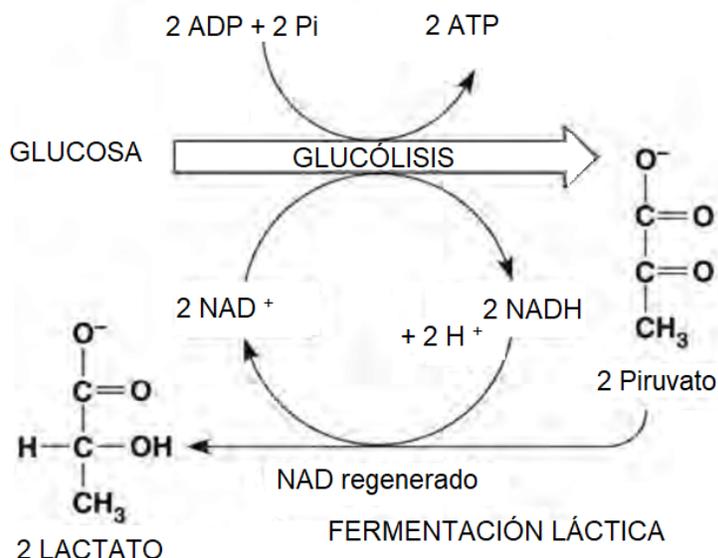
Fuente. RUIZ, M. I. y MOLINA, D. R. determinación de los parámetros hidrolíticos para la producción de jarabes de glucosa a partir de almidón de yuca. p. 3

Después mediante la fermentación láctica se utiliza glucosa para obtener energía y producir el ácido láctico (Figura 4). Este proceso lo realizan las bacterias ácido láctica (BAL), algunos hongos, algunos protozoos y en los tejidos animales. Las BAL son un grupo de bacterias gram positivas que fermentan hidratos de carbono convirtiéndolos en ácido láctico¹⁵.

¹⁴ BERNAL BUSTOS, Claudio Raúl, *et al.* Hidrólisis enzimática de almidón. *Fundación Universidad de América Revista de Investigación*. 2017, vol. 10, nro. 1. pp. 129-140

¹⁵ TEJADA TOVAR, Ronald Eduardo. Obtención de ácido láctico por fermentación de almidón de ñame espino mediante el *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus* y el *Streptococcus thermophilus* para su uso en la producción de ácido poliláctico [En línea] Universidad de Cartagena - Universidad Nacional de Colombia sede Medellín, 2015.

Figura 4. Ruta metabólica de la fermentación ácido láctica para la producción de ácido láctico



Fuente. MARCIA, E., *et al.* Estudio de la fermentación láctica para la extracción de quitina a partir de desechos de crustáceos. *Nexo Revista Científica*. 2011, vol. 24, nro. 1. pp. 33-42

El PLA se puede sintetizar a través de tres rutas principales (Figura 5), por polimerización directa por condensación del ácido láctico (2-hidroxi ácido propanoico), por condensación azeotrópica deshidratante o por polimerización de apertura del anillo de lactida¹⁶.

El ácido láctico se polimeriza directamente en presencia de un disolvente y un catalizador. La reacción se realiza mediante la aplicación de alto vacío y elevada temperatura para eliminar el agua que se genera durante la reacción de condensación¹⁷. La reacción empieza con la protonación del oxígeno, posteriormente el carbono de este mismo grupo sufre un ataque nucleofílico por parte de un hidroxilo de otra molécula de monómero, formándose una estructura tetraédrica, luego se elimina una molécula de agua y un protón y se forma de esta

¹⁶ AURAS, R. HARTE, B. SELKE, S. An overview of polylactides as packaging materials. *Macromolecular Bioscience*. 2004;4(9):835-864. citado por ARRIETA, Marina. Films de PLA y PLA-PHB plastificados para su aplicación en envases de alimentos. Caracterización y análisis de los procesos de degradación.

¹⁷ VINK, ETH. RÁBAGO, KR. GLASSNER, DA. GRUBER, PR. Applications of life cycle assessment to Nature Works™ polylactide (PLA) production. *Polymer Degradation and Stability*. 2003 403-419

manera un enlace éster; este proceso continúa varias veces hasta formar las cadenas largas de polímero¹⁸.

En la síntesis por condensación deshidratante azeotrópica se ejecuta una destilación a baja presión y 130 °C durante 2-3 horas y se elimina la mayor parte del agua que se produce durante la reacción de condensación. Luego se añade un catalizador y se recircula el disolvente a través de un tubo unido al recipiente de la reacción que contiene tamices moleculares a 130 °C durante 30-40 horas adicionales. Finalmente, se aísla el polímero o se disuelve y se precipita para una purificación adicional¹⁹. Este método deja residuos del catalizador considerables debido a la alta concentración que se necesita para alcanzar un rendimiento de reacción adecuado. Como consecuencia tiene desventajas en el procesado, como degradación o hidrólisis, sobre todo en aplicaciones biomédicas, donde la toxicidad del catalizador es un factor muy importante²⁰.

La polimerización por apertura de anillo (ring-opening polymerization, ROP) es una polimerización en la que a partir de un monómero cíclico se obtiene una unidad monomérica acíclica o con un menor contenido en ciclos que el monómero²¹. La ROP se compone de tres etapas: policondensación, formación de lactida y la polimerización por apertura de anillo de la lactida. El proceso consiste en eliminar agua bajo condiciones suaves sin la intervención de solventes, pues busca producir un dímero cíclico intermedio, lactida. Este monómero es purificado en una destilación a vacío²².

¹⁸ OROZCO OLIVARES, Fatima. Producción de ácido láctico por medio de fermentación anaerobia y su polimerización a partir de reacciones de apertura de anillo [En línea] Mérida: Centro de investigación científica de Yucatán, A. C., 2011. 31 p

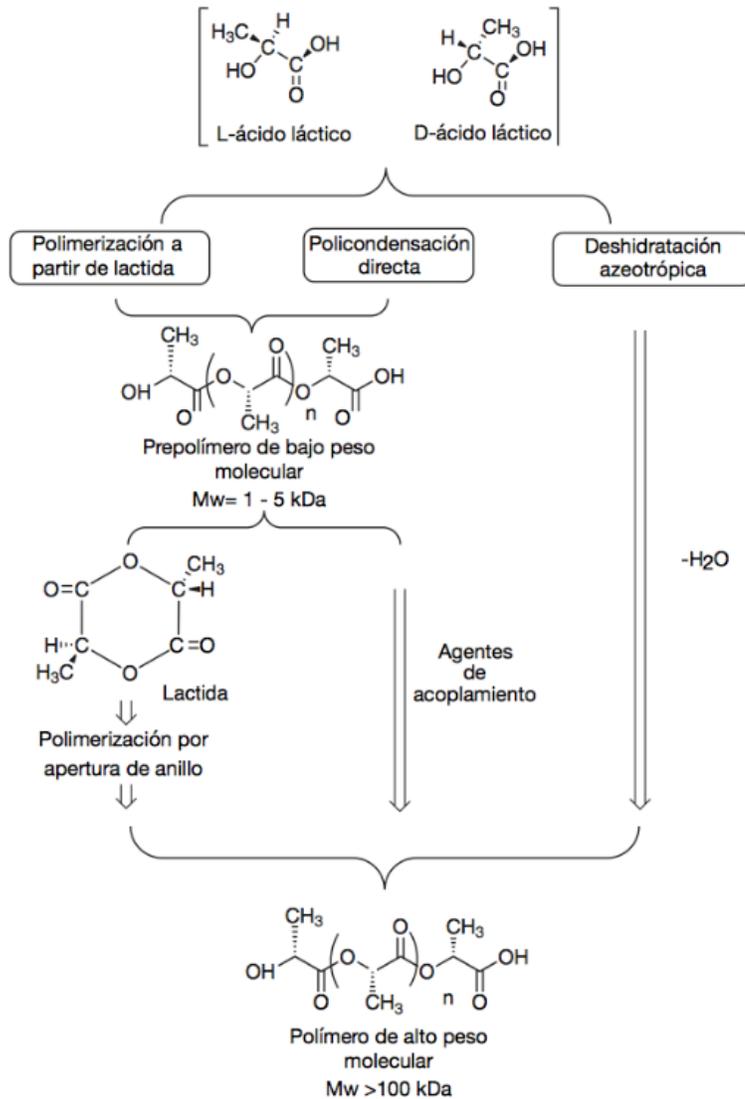
¹⁹ AURAS, R. HARTE, B. SELKE, S. An overview of polylactides as packaging materials. *Macromolecular Bioscience*. 2004;4(9):835-864. citado por ARRIETA, Marina. Films de PLA y PLA-PHB plastificados para su aplicación en envases de alimentos. Caracterización y análisis de los procesos de degradación.

²⁰ SÖDERGÅRD, A. y STOLT, M. Industrial Production of High Molecular Weight Poly(Lactic Acid) en *Poly (Lactic Acid)*, John Wiley & Sons, Ltd, 2010, pp. 27-41

²¹ JONES, R. G. *et al.*, Eds. Glossary of Basic Terms in Polymer Science. En *Compendium of Polymer Terminology and Nomenclature: IUPAC Recommendations 2008*, The Royal Society of Chemistry, 1996, pp. 3-21

²² NÚÑEZ SALINAS, Manuel. Planta de producción de ácido poliláctico (PLA) a partir de ácido láctico [En línea] Universidad de Sevilla, 2019. 12 p.

Figura 5. Principales procesos de síntesis de PLA



Fuente. HARTMANN, M. H. High Molecular Weight Polylactic Acid Polymers, en Biopolymers from Renewable Resources. KAPLAN, D. L. Ed. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, 1998, pp. 367-411

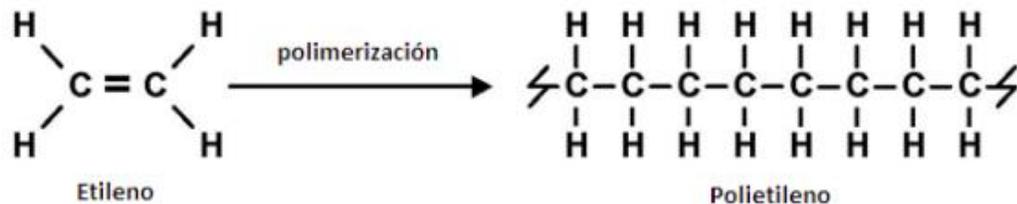
La aplicación más prometedora del PLA es en envases y empaques para alimentos y producción de películas para la protección de cultivos en estados primarios y para la producción de envases rígidos²³. Destacan los usos prácticos como pitillos,

²³ RODRÍGUEZ, Ángela. Desarrollo de una técnica alternativa de biodegradación en condiciones aerobias para el ácido poliláctico y mezcla PVA – almidón frente al polietileno en un medio sólido. [En línea] Bogotá. Fundación Universidad de América, 2012. 23 p.

cubiertos, platos, tazas y tapas que al terminar su ciclo útil pueden ser tratados junto con residuos orgánicos para incorporarse a la corriente de biomasa.

1.1.3 Polietileno (PE). El polietileno es un termoplástico compuesto exclusivamente por carbono e hidrogeno, cuya fórmula general es $[\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2]_n$ que es un tipo común de plástico, debido a muchas de sus cualidades y propiedades²⁴. Destacándose su lubricidad, resistencia al impacto y abrasión, y por ser químicamente inerte²⁵. Este se obtiene mediante la polimerización del etileno (Figura 6).

Figura 6. Obtención del polietileno (PE)



Fuente. CEDRÓN, Juan Carlos. Polímeros. [En línea]. Disponible en: <http://corinto.pucp.edu.pe/quimicageneral/contenido/82-polimeros.html>

Se clasifica en tres tipos básicos de acuerdo a su grado de polimerización:

Polietileno de baja densidad (LDPE) siendo un polímero parcialmente cristalino (50-60%), cuya temperatura de fusión (T_m) está en la región de 110 a 115 °C y densidad entre 0.912 y 0.925 g/cm³²⁶. Aplicado en películas de envasado industrial y agrícola, envasado de alimentos líquidos y sólidos, películas de alimentos laminados y plastificados, envases farmacéuticos y hospitalarios, juguetes y artículos para el hogar, revestimiento de alambres y cables, tubos y mangueras²⁷.

Polietileno de alta densidad (HDPE) con grado de cristalización por encima de 90%, su temperatura de fusión cristalina es aproximadamente 132°C y su densidad está entre 0,95 y 0,97 g / cm³²⁸. Usado en envases para: detergentes, lejía, aceite automotor, shampoo, lácteos; bolsas para supermercados; cajones para pescados, gaseosas, cervezas; envases para pintura, helados, aceites; tuberías para gas,

²⁴ R. R. K. Pramila, «Biodegradation of low density polyethylene (LDPE) by fungi isolated from marine water-a SEM analysis,» African Journal of Microbiology Res, vol. 5, pp. 5013-5018, 2011a.

²⁵ KURTZ, SM. The UHMWPE Handbook: Ultra high molecular weight polyethylene in total joint replacement. San Diego California: Elsevier Academic Press; 2004

²⁶ COUTINHO, Fernanda M. B. MELLO, Ivana L. SANTA MARIA, Luiz C. Polietileno: principais tipos, propriedades e aplicações. *Polímeros: Ciência e Tecnologia*. 2003, vol. 13, nro.1. pp. 1-13

²⁷ *Ibíd.*, p.3.

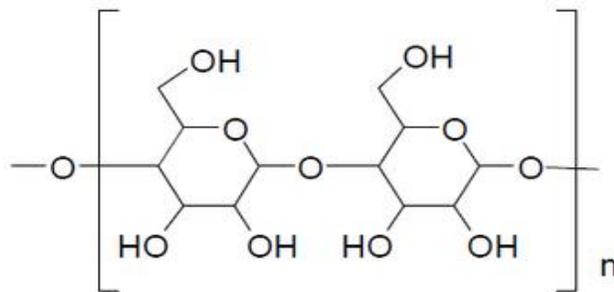
²⁸ *Ibíd.*, p. 4.

telefonía, agua potable, láminas de drenaje y uso sanitario; y en construcción de embarcaciones²⁹.

1.1.4 Celulosa. La celulosa es el componente fundamental de la pared de las células vegetales en plantas, madera y fibras naturales, y se encuentra combinada, generalmente, con sustancias como la lignina, hemicelulosas (carbohidratos más cortos principalmente pentosanos), pectinas y ácidos grasos. La celulosa es un polímero lineal (Figura 7) compuesto por unidades de glucosa. Las cadenas de celulosa se acoplan en haces unidos por puentes de hidrógeno³⁰.

Su principal aplicación es en la manufactura de papeles y cartones y también, en pequeñas cantidades, se encuentra en productos como el crayón, películas fotográficas, celofanes, explosivos; además, otros derivados como la trementina y el “tall oil” que son usados como insumos en la industria química para la producción de aromas, diluyentes, jabones y alimentos³¹.

Figura 7. Monómero de la Celulosa



Fuente. TEJEDOR SANZ, Ascensión. Tecnología de la celulosa. La industria papelera. [En línea]. Disponible en: <https://www.eii.uva.es/organica/qoi/tema-03.php>

²⁹ Clase Construcción y Estructura Náutica, 2015. HDPE, Polietileno De Alta Densidad. HDPE, Polietileno De Alta Densidad

³⁰ SANZ, Ascensión. Tecnología de la celulosa. La industria papelera [En línea]. [27 de noviembre de 2019]. Disponible en: <https://www.eii.uva.es/organica/qoi/tema-03.php>

³¹ RODRÍGUEZ, Ángela. Desarrollo de una técnica alternativa de biodegradación en condiciones aerobias para el ácido poliláctico y mezcla PVA – almidón frente al polietileno en un medio sólido. [En línea] Bogotá. Fundación Universidad de América, 2012. 23 p.

1.2 DEGRADACIÓN

Se conoce como degradación de un polímero a cualquier cambio químico o físico que sea producto de factores ambientales como luz, calor, humedad, condiciones químicas o actividad biológica. La degradación se ve reflejada en cambios en diferentes propiedades del material, tales como: propiedades mecánicas, características ópticas o eléctricas, agrietamiento, erosión, decoloración, separación de fases o de laminación³². Entre los muchos agentes que pueden causar degradación de los polímeros están aquellos con naturaleza física, como las cargas, el calor y la luz, y aquellos que se caracterizan por sus efectos químicos, como la oxidación y la hidrólisis³³. Estos agentes suponen aceleradores de la degradación pues promueven cierta alteración de la vida útil al exponer el material a un medio diferente para el cual fue diseñado. Se puede clasificar la degradación en función al modo de iniciación.

1.2.1 Degradación química. Involucra modificaciones químicamente estructurales en el material polimérico a causa de la inducción de un reactivo químico que entra en contacto con el polímero, la degradación puede darse por la reacción química de sus componentes por separado o en forma de desintegración de la cadena.

1.2.1.1 Oxidación. La degradación oxidativa consiste en el ataque de oxígeno activo sobre el polímero; en el fondo, es una reacción orgánica de oxidación-reducción. Tal y como ocurre en el envejecimiento térmico, el oxígeno origina radicales libres en las cadenas de polímeros, que pueden dar todo tipo de reacciones secundarias degradativas³⁴. Para que ocurra una reacción con el oxígeno debe existir un mecanismo que inicie la producción de radicales libres, como la luz ultravioleta, radicación a gama, tensiones mecánicas, o la acción de la electricidad. Las pequeñas cantidades de peróxidos, compuestos oxigenados, e impurezas incorporadas en el polímero durante su procesamiento pueden tener efectos significativos sobre la tasa de iniciación y la oxidación³⁵.

1.2.1.2 Hidrólisis. Este tipo de envejecimiento es causado por la acción conjunta del agua y ácidos o bases fuertes. Mediante la introducción de grupos funcionales hidrolizables en la cadena principal del polímero, las cadenas de éste se vuelven

³² RODRÍGUEZ CLAROS, Monica. Efectos de la modificación de almidón de yuca y su mezcla con poli (ácido láctico) (PLA) sobre su biodegradación [En línea] Universidad de los Andes, 2012. 52 p

³³ POSADA BUSTAMANTE, Beatriz. La degradación de los plásticos. *Revista Universidad Eafit*. 1994. Vol. 30.

³⁴ MIRANDA, José. Reacciones y sus mecanismos en la degradación de polímeros [En línea] Instituto politécnico nacional escuela superior de ingeniería química e industrias extractivas, 2015. p 70.

³⁵ POSADA. Óp. Cit., p 16.

más susceptibles en medios acuosos³⁶. La degradación hidrolítica de materiales poliméricos sintéticos toma lugar cuando los polímeros contienen grupos hidrolizables como: ésteres, amidas, carbonatos y uretanos, además estos grupos funcionales están expuestos a la humedad³⁷.

1.2.2 Termodegradación. La degradación térmica consiste en la escisión de los enlaces de cadenas moleculares por las altas temperaturas. Durante el procesado de polímeros estos se exponen a elevadas temperaturas, por ejemplo durante el proceso de extrusión³⁸. La degradación térmica ocurre cuando el polímero se expone a temperaturas elevadas, y este experimenta cambios químicos sin que haya intervención de otras sustancias³⁹. La estabilidad térmica de los polímeros es influenciada por dos elementos:

El primero es un proceso reversible y representa el ablandamiento del material al aumentar la temperatura. El segundo mecanismo es la descomposición irreversible de la sustancia debido al calor. Este proceso dependerá tanto de la temperatura como del tiempo y además también se afecta por otros factores como la atmósfera circundante.⁴⁰

1.2.3 Degradación por radiación. La exposición a la radiación altera los materiales de distintas maneras dependiendo del tipo, se distinguen los siguientes:

1.2.3.1 Fotodegradación (radiación UV). La energía que posee va de 72 a 100 Kcal, y es la suficiente para producir la rotura de los enlaces covalentes y ocasionar el amarillamiento y fragilidad de los polímeros orgánicos. Es el caso de películas de polietileno que son usadas en la agricultura y con el tiempo pierden elasticidad, se hacen frágiles, quebradizas y por tanto tienden a rasgarse fácilmente⁴¹. Deterioro que es causado principalmente por la liberación de grupos carbonilo en la reacción de foto-oxidación.

³⁶ MIRANDA, José. Reacciones y sus mecanismos en la degradación de polímeros [En línea] Instituto politécnico nacional escuela superior de ingeniería química e industrias extractivas, 2015. 71 p.

³⁷ HALIM HAMID S., B. AMIN M. MAADHAH A., Handbook of Polymer Degradation, Marcel Dekker, Inc., New York, 1992. Citado por. MIRANDA, José. Reacciones y sus mecanismos en la degradación de polímeros.

³⁸ MIRANDA, José. Reacciones y sus mecanismos en la degradación de polímeros [En línea] Instituto politécnico nacional escuela superior de ingeniería química e industrias extractivas, 2015. p 61.

³⁹ POSADA BUSTAMANTE, Beatriz. La degradación de los plásticos. *Revista Universidad Eafit*. 1994. Vol. 30.

⁴⁰ *Ibíd.*, p. 6.

⁴¹ MIRANDA, *Óp. cit.*, p 65.

1.2.3.2 Degradación por radiaciones de alta energía. Esta degradación acelerada es importante para la aplicación de polímeros en el espacio, donde los materiales cobran especial interés por su ligereza y carácter dieléctrico. Durante el proceso se forman electrones con energía adicional. Genera disminución de peso molecular, entrecruzamiento y reticulación⁴².

1.2.4 Degradación mecánica. Tiene que ver con los efectos macroscópicos que llevan a la fractura y la deformación producidos por el influjo de fuerzas, así como los cambios químicos inducidos por los esfuerzos mecánicos⁴³, también se presenta durante el proceso de extrusión debido a las altas fuerzas de cizalla, a causa de la longitud que tienen las moléculas de los polímeros, estas poseen la capacidad de convertir la energía mecánica aplicada en energía cortante para los enlaces de la cadena principal lo que resulta en pérdida de peso molecular⁴⁴. En todos esos procesos relacionados, los enlaces químicos de las cadenas del polímero se pueden romper, esto depende del estado del material, que puede ser sólido (vítreo o cristalino), cauchoso como el hule (viscoelástico) y fundido (elastoviscoso)⁴⁵.

1.2.5 Biodegradación. La biodegradabilidad es un proceso metabólico y enzimático realizado por los microorganismos como bacterias y algunos hongos, los cuales secretan enzimas que se encargan de romper la estructura molecular del plástico degradándole en el tiempo⁴⁶. La descomposición puede llevarse a cabo en presencia de oxígeno (aeróbica) (Ecuación 1) o en su ausencia (anaeróbica)⁴⁷ (Ecuación 2) siendo los productos del proceso biomasa y biogás (dióxido de carbono y metano)

⁴² RINCÓN, Paula. Evaluación de la biodegradación del polipropileno, en un proceso de vermicompostaje, envejecido por termo- degradación [En línea] Fundación Universidad de América, 2015. 28 p.

⁴³ POSADA BUSTAMANTE, Beatriz. LA DEGRADACION DE LOS PLASTICOS. *Revista Universidad Eafit*. 1994. Vol. 30.

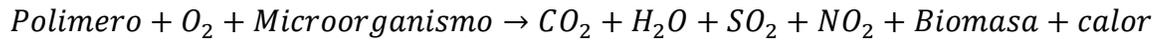
⁴⁴ MIRANDA, José. Reacciones y sus mecanismos en la degradación de polímeros. Tomado de. Halim Hamid S., B. Amin M. y G. Maadhah A., *Handbook of Polymer Degradation*, Marcel Dekker, Inc., New York, 1992.

⁴⁵ POSADA BUSTAMANTE. Óp. Cit., p. 12.

⁴⁶ TOKIWA, J.; 2009."Biodegradability of Plastics". National Institute of Advanced Industrial Science and Technology. Higashi – Japón, 367-377. Citado por. MEZA, Mauricio. Biodegradabilidad de polietileno tereftalato y de oxopolietileno, a nivel de laboratorio, por la acción de bacterias nativas presentes en humus de lombriz, caballo y gallina.

⁴⁷ RODRÍGUEZ, Ariel. Biodegradabilidad de materiales bioplásticos. *Ciencia y Tecnología de los Alimentos*. 2012, vol. 22,

Ecuación 1. Reacción en medio aerobio



Fuente. RODRÍGUEZ, Ariel. Biodegradabilidad de materiales bioplásticos. *Ciencia y Tecnología de los Alimentos*. 2012, vol. 22

Ecuación 2. Reacción en medio anaerobio



Fuente. RODRÍGUEZ, Ariel. Biodegradabilidad de materiales bioplásticos. *Ciencia y Tecnología de los Alimentos*. 2012, vol. 22

Los factores que influyen en el proceso biodegradativo son las condiciones del medio (pH, temperatura, humedad, etc.), las características del polímero (peso molecular, enlaces químicos susceptibles al hidrólisis, presencia de monómero residual o aditivos, etc.), dimensiones del material y las características del microorganismo (cantidad, concentración, tipo y fuente) La biodegradabilidad del plástico involucra los siguientes pasos: Degradación primaria del plástico (pre-tratamiento), fijación de microorganismos a la superficie. Crecimiento de los microorganismos utilizando el plástico como fuente de carbono, tasa de absorción de oxígeno, tasa de evolución de dióxido de carbono, cambios en la estructura de la superficie del plástico⁴⁸.

En la práctica, los ensayos de biodegradabilidad, de acuerdo con la técnica empleada en su determinación, se dividen en dos grandes grupos: Los ensayos respirométricos, basados en medir el consumo de oxígeno total por los microorganismos o su velocidad de asimilación. Y los ensayos con lodos activos, donde se coloca los polímeros en contacto con microorganismos en concentración elevada para originar un proceso análogo al de depuración de aguas residuales por lodos activados⁴⁹.

1.2.5.1 Degradación aerobia. El grado de biodegradación aerobia se confirma evaluando el contenido de dióxido de carbono gaseoso producido por el polímero. Hay dos factores que afectan la biodegradación aerobia, estos son la exposición a condiciones controladas de compostaje y las características propias del polímero⁵⁰.

⁴⁸ MEZA, Mauricio. Biodegradabilidad de polietileno tereftalato y de oxopolietileno, a nivel de laboratorio, por la acción de bacterias nativas presentes en humus de lombriz, caballo y gallina [En línea] Escuela politécnica del ejército, 2013.

⁴⁹ POSADA BUSTAMANTE, Beatriz. La degradación de los plásticos. *Revista Universidad Eafit*. 1994. Vol. 30.

⁵⁰ PALECHOR, Jhon. Biodegradación aerobia bajo condiciones controladas de compostaje de una película flexible y una bandeja semirrígida obtenidas a partir de almidón y harina de yuca [En línea] Universidad Nacional de Colombia, 2017.

Los métodos más comunes que permiten hacer el seguimiento en las pruebas de biodegradación aerobia en materiales plásticos son principalmente tres, método respirométrico, método por titulación y método gravimétrico.

- Método respirométrico: el principio del método se basa en la medición de la cantidad de gases que se generan en un ambiente controlado, o en una célula (o biorreactor), los gases se miden por medio del uso de un sensor de infrarrojo, los gases que comúnmente se miden son dióxido de carbono, oxígeno y metano.⁵¹ El método, aplicado a un proceso de biodegradación, se basa en un biorreactor o célula respirométrica herméticamente cerrada, la cual debe poseer un sistema que permita el control de la temperatura, la humedad y el flujo de aire.
- Método por titulación: de manera similar al método respirométrico, mide los gases emitidos en un biorreactor. Para determinar el nivel de degradabilidad se trabaja con una solución de una base fuerte que actúa como trampa de CO₂, lo que permite calcular la cantidad aproximada de carbono liberado de la muestra. Para medir la cantidad de CO₂ producido, se emplean titulaciones utilizando una solución de ácido fuerte y fenolftaleína como indicador.
- Método gravimétrico: consiste en usar cloroformo como solvente para extraer el polímero de la biomasa liofilizada, posteriormente precipitarlo con dietil éter o acetona, y finalmente secarlo y pesarlo.⁵² Otra metodología válida se basa en el hecho de que, bajo condiciones controladas de tiempo y temperatura, el material se disuelve en una solución alcalina de hipoclorito de sodio de manera que el bioplástico se libera y es recuperado por centrifugación y posteriormente secado y pesado⁵³.

1.3 MEDIOS DEGRADATIVOS

Agentes que producen cambios, que suelen ser agresivos, en los polímeros producto de la interacción biológica de microorganismos cuando las condiciones ambientales favorecen la acción.

⁵¹ *Ibíd.*, p. 36.

⁵² GROTHE, Enrico. MOO-YOUNG, Murray. y CHISTI, Yusuf. (1999). Fermentation optimization for the production of poly (beta-hydroxybutyric acid) microbial thermoplastic. *Enzyme and Microbial Technology*. 1999, Vol. 25.

⁵³ HAHN, Sei Kwang. CHANG, Yong Keun. KIM, Beom Soo. CHANG Ho Nam (1994). Optimization of microbial poly (3-hydroxybutyrate) recovery using dispersions of sodium-hypochlorite solution and chloroform. *Biotechnol. Bioengineering*. 1994, Vol. 44.

1.3.1 A. *brasiliensis*. Es un hongo filamentoso, formado por hifas, de tipo mesófilo y aerobio. Se encuentra en el grupo de los aspergilos negros, el cual se clasifica dentro de la familia *moniliaceae*, orden *moniliales*, clase *hyphomicetes*, filum *deuteromycota*⁵⁴, produce diversos compuestos de gran interés para las industrias farmacéuticas y de alimentos (enzimas, ácidos orgánicos), y es el principal productor de ácido cítrico a nivel industrial por cultivo líquido⁵⁵

1.3.2 Lodo activado. Biomasa obtenida en el tratamiento aerobio de aguas residuales. La materia orgánica compleja presente en las aguas residuales se oxida hasta CO₂, H₂O, NH₃ y biomasa. En el tratamiento debe mantenerse un ambiente aerobio por medio de aireación mecánica o por difusores⁵⁶, donde microorganismos se forma en presencia de oxígeno disuelto.

1.3.3 Bioaumentación. El principio es la utilización de microorganismos para incrementar la capacidad degradativa de una población microbiana natural. Consiste en inocular microorganismos vivos que han sido especialmente aislados y seleccionados por su alta capacidad de degradar los contaminantes promoviendo su biodegradación o su biotransformación⁵⁷.

1.4 CARACTERIZACIÓN DE MATERIALES

El deterioro de los polímeros puede medirse de forma cualitativa y/o cuantitativa a través de distintas pruebas que posibilitan el estudio de propiedades físicas, químicas y también facilitan la apreciación en el cambio de apariencia y la morfología superficial en el proceso biodegradativo. Para efectos de investigación, estas técnicas otorgan cierta valoración objetiva del análisis estructural de los polímeros. A continuación, se revisan las técnicas empleadas para desarrollo de esta obra.

⁵⁴ KWON-CHUNG, K.J. y BENNETT, Jhon. (1992). *Medical Micology*. Filadelfia-London: Lea & Febiger, pp. 223-234. Citado por. SÁEZ VEGA, Alex; FLORES VALDES, Liliana y CADAVID RENDON, Andrés. Caracterización de una cepa nativa de *Aspergillus niger* y evaluación de la producción de ácido cítrico.

⁵⁵ REYES OCAMPO, I.; LOPEZ ISUNZA, Felipe y GONZÁLEZ BRAMBILA, Margarita. Un análisis del metabolismo de *aspergillus niger* creciendo sobre un sustrato sólido. *Revista Mexicana de Ingeniería Química*. 2013, vol. 12, nro. Academia Mexicana de Investigación y Docencia en Ingeniería Química A.C

⁵⁶ MOELLER, Gabriela. Microbiología de lodos activados. *Journal of Chemical Information and Modeling*. 2010. 148–208

⁵⁷ Amerex. BIOAUMENTACIÓN: Una solución para aumentar la eficacia y la eficiencia en las plantas de tratamiento de efluentes [En línea]. <http://www.labamerex.com/novedad019.htm>. Consultado el 4 diciembre de 2019.

1.4.1 Electroscopio de transmisión de infrarrojo por transformada de Fourier (FTIR). Esta técnica se basa en la absorción de luz de ciertas frecuencias debidas a los movimientos de rotación, flexión, acortamiento y alargamiento de los grupos funcionales, respecto a un eje de simetría. El método consiste en incidir una irradiación sobre las moléculas que experimentan vibraciones y oscilaciones de modo similar a dos pelotas unidas por un resorte. La energía adquirida provoca un aumento en la amplitud de las vibraciones de los átomos enlazados, es decir, la molécula se sitúa en un estado vibracional excitado⁵⁸. Resulta útil pues sirve para determinar la presencia de grupos funcionales específicos de diversos materiales. Por ello, la señal se registra por la variación de la energía (transmitida) debida a la absorción del compuesto estudiado en función de la longitud de onda o de la frecuencia característica⁵⁹.

1.4.2 Microscopia electrónica de barrido (SEM). Esta es una técnica para la obtención de imágenes de superficies con alta resolución, utiliza electrones para la obtención de imágenes de igual forma que el microscopio óptico utiliza luz visible. Un haz de electrones barre la superficie de la muestra, y los electrones que emite la muestra dan como resultado la imagen de la superficie⁶⁰. Para obtener la imagen se utiliza principalmente los electrones secundarios, que permiten trabajar con mayor resolución en el estudio topográfico de superficies. Por otra parte, el contraste en las imágenes que se forman mediante la detección de electrones retrodispersados está basado en el número atómico, resolviendo de este modo las variaciones de composición a nivel microscópico a la vez que proporciona información⁶¹.

1.5 ESTANDARES PARA LA EVALUACIÓN AMBIENTAL DE LOS PLÁSTICOS

Actualmente se cuentan con diversas normas internacionales para estandarizar las especificaciones y métodos de prueba de la biodegradación de materiales plásticos llevando así un control de este material, vinculadas a las siguientes normatividades:

1.5.1 EN 13432:2000. (Norma Europea). 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. Esta norma establece

⁵⁸ MIRANDA, José. Reacciones y sus mecanismos en la degradación de polímeros [En línea] Instituto politécnico nacional escuela superior de ingeniería química e industrias extractivas, 2015

⁵⁹ *Ibíd.*, p. 81.

⁶⁰ CORREA, Liz. ZULUAGA, Fabio. VALENCIA, Carlos. GODOY, Jorge Eduardo. Elaboración de andamios porosos osteoinductivos de poli (ácido l-láctico) / quitosano para la regeneración de tejido óseo. *Revista Colombiana de Materiales*. 2015, vol. 6, pp. 34-53

⁶¹ GOLDSTEIN, J., "Scanning electron microscopy and x-ray microanalysis", Kluwer Academic/Plenum Publishers, Vol. 140, No. 06 2003, pp 689

los requisitos que debe cumplir un material para ser compostable, entre los que se encuentra la biodegradación del mismo con un mínimo del 90% en 6 meses, o acabo de 3 meses la masa debe estar constituida como mínimo por el 90% de fragmentos inferiores a 2 mm, así como la comprobación de la ausencia de efectos ecotóxicos⁶². Para realizar la especificación de biodegradabilidad del material se pueden aplicar diversos estándares de métodos de prueba (medio acuoso aerobio):

1.5.2 ISO 14851:2019. Determinación de la biodegradabilidad aeróbica final de materiales plásticos en un medio acuoso, método mediante el análisis de oxígeno⁶³.

1.5.3 ISO 14852:2018. Determinación de la biodegradabilidad aeróbica final de materiales plásticos en un medio acuoso aeróbico a temperatura de 20-25°C (± 1), mediante el análisis de dióxido de carbono, con criterio de validación de mayor a 60% de biodegradación⁶⁴.

1.5.4 ISO 14855:2018. Determinación de la biodegradabilidad aeróbica final y desintegración de los materiales plásticos en condiciones de compostaje controladas, método de análisis de dióxido de carbono⁶⁵.
La norma EN 13432:2000 recomienda que siempre que sea posible, se utilice la norma ISO 14855.

1.5.5 ASTM D6400-04. (American society for testing and materials): Guía estándar desarrollada para exponer, y verificar que, los plásticos se degradan en el Medio Ambiente por efecto de una combinación de oxidación y biodegradación. Establecer requisitos para el etiquetado de plásticos designados para ser compostados aeróbicamente en instalaciones municipales o industriales, requisitos como la seguridad, comprobación la ausencia de efectos tóxicos y una biodegradación inherente, la conversión del carbón en dióxido de carbono en niveles entre el 60% y 90% en un término de 180 días⁶⁶.
Hace referencia a la ISO 17088-2012 especificaciones para plásticos compostables.

⁶² NORMA EUROPEA EN13432. Año 2000.

⁶³ ISO. ISO 14851. Año 2019. Determination of the ultimate aerobic biodegradability of plastic materials in an aqueous medium — Method by measuring the oxygen demand in a closed respirometer

⁶⁴ ISO. ISO 14852. Año 2018. Determination of the ultimate aerobic biodegradability of plastic materials in an aqueous medium — Method by analysis of evolved carbon dioxide.

⁶⁵ ISO. ISO 14855. Año 2018. Determination of the ultimate aerobic biodegradability of plastic materials under controlled composting conditions — Method by analysis of evolved carbon dioxide — Part 2: Gravimetric measurement of carbon dioxide evolved in a laboratory-scale test

⁶⁶ NORMA ASTM D 6400-04. Standard specification for labeling of plastic designed to be aerobically composted in municipal or industrial facilities.

1.5.6 ASTM D5247-92. (American society for testing and materials): Método de prueba estándar para determinar la biodegradabilidad aeróbica de plásticos degradables por microorganismos específicos. La degradación se evaluará mediante la pérdida de peso, la pérdida de resistencia a la tracción, el porcentaje de pérdida de elongación y los cambios en la distribución del peso molecular⁶⁷. Las normatividades anteriormente mencionadas son importantes ya que son la guía para el desarrollo del proyecto, con base a ellas se plantea una metodología a seguir para cumplir cada objetivo propuesto, definen condiciones de cultivo, duración del test, método de medición y criterios de evaluación para dar una respuesta confiable de la función de biodegradación del PLA.

⁶⁷ NORMA ASTM D 5247-92. Standard test method for determining the aerobic biodegradability of degradable plastics by specific microorganisms.

2. DESARROLLO EXPERIMENTAL

Se establece que la norma ISO 14852:2018 titulada “Determinación de la biodegradación aeróbica completa de materiales plásticos en un medio acuoso por el método de análisis de dióxido de carbono liberado”, es la guía principal, por su contenido específico de características de sustancias de prueba, inóculos, reactivos y el criterio de validación para materiales biodegradables.

El empaque plástico comercial de PLA se encuentra en una presentación de bolsa de 10x20 cm de color transparente, este material estará expuesta a tres clases de inóculo, un microorganismo específico, *A. brasiliensis*, lodo activo y lodo activo bioaumentado con *A. brasiliensis*. La implementación de la técnica está diseñada para producir resultados de ensayo reproducibles y repetibles debido a que los tres inóculos se encuentran a condiciones de temperatura y flujo de aire controladas y vigiladas, por medio de este escenario se pretende calcular el porcentaje de biodegradación debido a la generación de dióxido de carbono, método de análisis que especifica la norma cumpliendo paso a paso cada uno de los objetivos.

Durante el desarrollo de este capítulo se presenta la selección de parámetros, la descripción de la red de equipos que se encuentran en el Anexo A, para el proceso de biodegradación que tiene un tiempo de prueba de 27 días, características de reactivos, inóculos y material de ensayo.

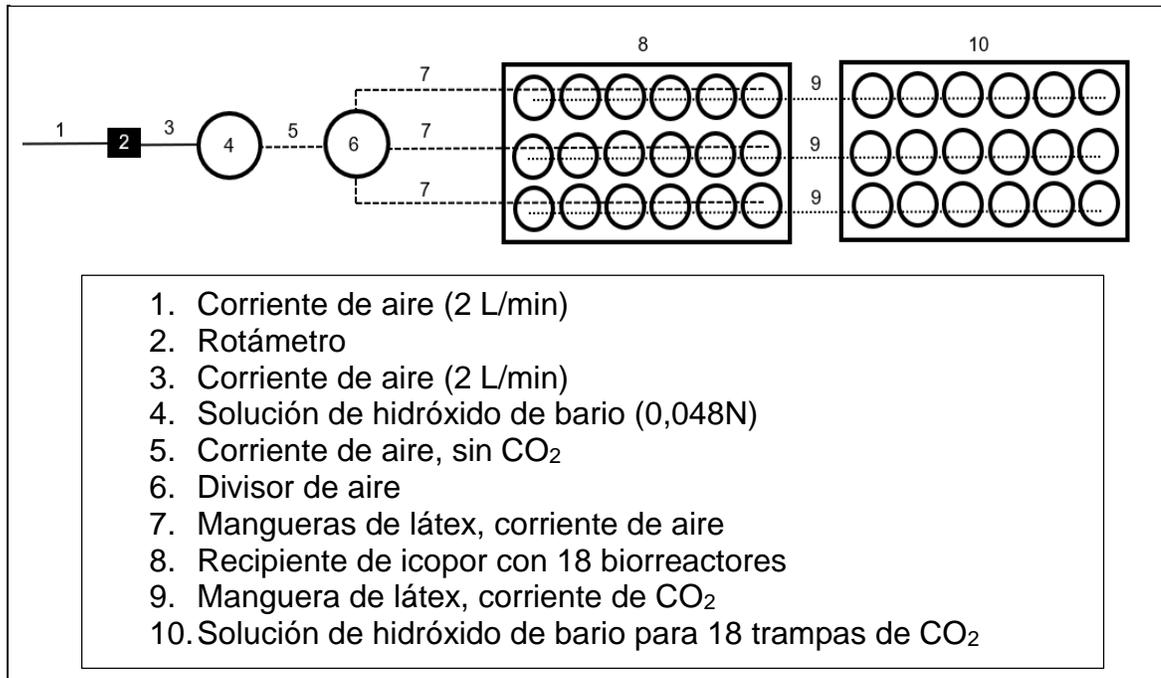
2.1 DESCRIPCIÓN DEL PROCESO

La corriente de aire de 2 L/min entra a un balón de vidrio el cual contiene un litro de la solución hidróxido de bario 0,048N, este para absorber el dióxido de carbono (CO₂) que pueda contener dicha corriente, proceso indispensable para que las soluciones de hidróxido de bario que se encuentran al final del proceso no se alteren por una cantidad de dióxido de carbono que ya estuviera presente. Luego se distribuye el aire a través de dos distribuidores de aire y conexiones de manguera de látex hacia los 18 biorreactores de 250 mL, cada uno con la cantidad específica de inóculo y muestra, estos se encuentran en el interior del recipiente de icopor que contiene agua a 25°C, esta temperatura se verifica diariamente para así mantener la temperatura en el rango adecuado de 20°C - 25°C.

Se inicia el proceso de biodegradación en cada uno de los biorreactores haciendo que se libere una determinada cantidad de dióxido de carbono, gas que es llevado mediante mangueras de látex a su correspondiente solución de hidróxido de bario (100 mL), solución que actúa como trampa para capturar el dióxido de carbono, esta solución es titulada, tomando 10 mL de la solución correspondiente a cada biorreactor, agregando 3 gotas de fenolftaleína como indicador y neutralizando con HCl 0,05N, esto para llevar el control de biodegradación.

Se lleva a cabo la medición de dióxido de carbono generado en un intervalo de tiempo regular, una vez al día alrededor de la misma hora, la Figura 8 muestra el diagrama del proceso, realizado en un área de 2,4 m x 0,8 m

Figura 8. Vista superior, red de equipos para proceso de biodegradación



Fuente. Elaboración propia.

2.1.1 Distribución de los biorreactores. La Tabla 1 se muestra la disposición de los 18 biorreactores dentro de la nevera de icopor, de esta misma manera también están dispuestas las soluciones de hidróxido de bario para las trampas de dióxido de carbono.

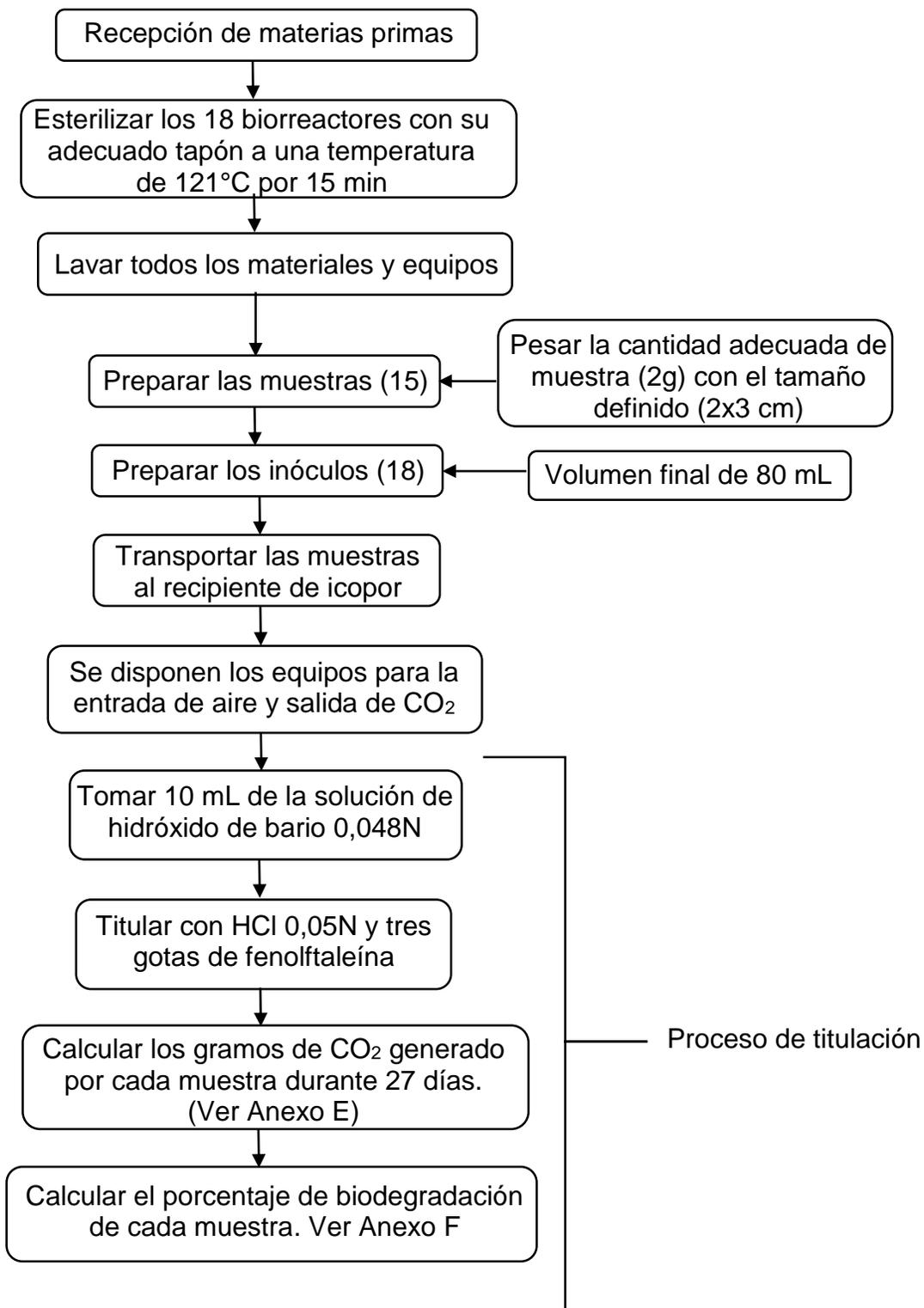
Tabla 1. Distribución de los biorreactores dentro de la nevera

A. brasiliensis	A	B	C	D	E	F
Lodo activo	A	B	C	D	E	F
Lodo activo bioaumentado un 10% con A. brasiliensis	A	B	C	D	E	F

A: muestra de blanco; B: muestra de Celulosa; C: muestra de HDPE; D: muestra de PLA; E: muestra de PLA (Réplica 1); F: muestra de PLA (Réplica 2)

Fuente. Elaboración propia

Diagrama 1. Procedimiento para el desarrollo de la técnica de biodegradación



Fuente. Elaboración propia.

2.2 CARACTERÍSTICAS DE LOS REACTIVOS Y PREPARACIÓN

Los reactivos necesarios para la prueba de biodegradación se muestran en la Tabla 2.

Tabla 2. Características de reactivos implementados

REACTIVO	FORMULA QUÍMICA	PROVEEDOR	GRADO DE PUREZA
Ácido clorhídrico.	HCl	Universidad Nacional de Colombia- Sede Bogotá	37%
Agua destilada.	H ₂ O	Universidad Nacional de Colombia- Sede Bogotá	NA
Alcohol.	C ₂ H ₆ O	Universidad Nacional de Colombia- Sede Bogotá	96%
Hidróxido de bario octahidrato.	Ba (OH) ₂	Fundación Universidad de América	98%
Fenolftaleína.	C ₂₀ H ₁₄ O ₄	Universidad Nacional de Colombia- Sede Bogotá	NA

Fuente. Elaboración propia

2.2.1 Preparación solución hidróxido de Bario (Ba (OH)₂). En el Anexo B se describe el procedimiento para preparar la solución de Ba (OH)₂, la cual tiene inicialmente una concentración de 0,048 N. Esta solución se usa como trampa de dióxido de carbono CO₂ tanto para la entrada de aire como en la salida de aire de cada uno de los biorreactores.

2.2.2 Preparación solución ácido clorhídrico (HCl). El Anexo C describe el procedimiento para preparar la solución de HCl 0,05 N. Esta solución se usa en el proceso de titulación para determinar la cantidad de miligramos emitidos de CO₂ en cada uno de los biorreactores.

2.3 CARACTERÍSTICAS Y PREPARACIÓN DE LOS INÓCULOS

Teniendo como base la norma ISO 14852:2018 se establecen las especificaciones para la evaluación de biodegradación del PLA en tres diferentes tipos de inóculos presentados en la Tabla 3.

Tabla 3. Características de los inóculos

INÓCULO	PROVEEDOR	ESPECIFICACIONES
<i>A. brasiliensis</i> ATCC 16404	Universidad Nacional de Colombia- Sede Bogotá	Concentración de 10 ⁶ esporas /mL
Lodo activo	PTAR de Funza	Concentración de 1000 mg/L
Lodo activo bioaumentado con <i>A.</i> <i>brasiliensis</i>	Universidad Nacional de Colombia- Sede Bogotá PTAR de Funza	Lodo activo con concentración de 1000 mg/mL, bioaumentado a un 10 % con <i>A.brasiliensis</i> de concentración 10 ⁶ esporas/mL

Fuente. Elaboración propia

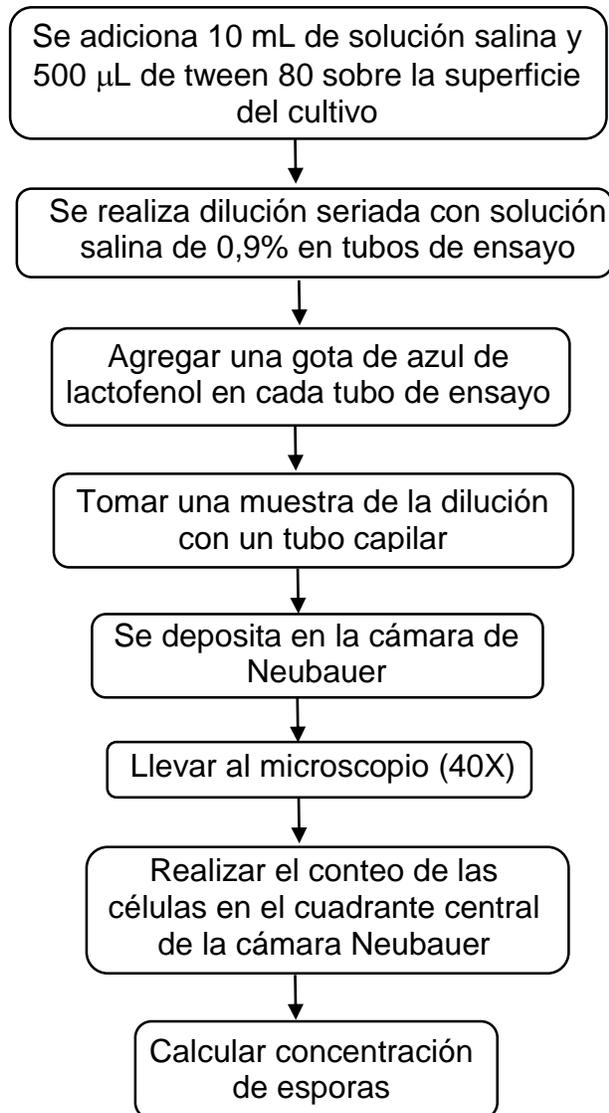
2.3.1 Preparación de los inóculos. Se establece un volumen final de 80 mL de inóculo en cada biorreactor de vidrio de 250 mL, la norma ASTM D5338-15 “Método de prueba estándar para la determinación de la biodegradación aeróbica de materiales plásticos”, define que no más de 3/4 del recipiente de prueba puede contener inóculo.

2.3.1.1 Preparación del inóculo de *A. brasiliensis*

- **Recuperación de la cepa liofilizada:** debido a que la cepa se encuentra liofilizada, como primer paso se hace la recuperación siguiendo el protocolo que establece el Instituto de Biotecnología de la Universidad Nacional de Colombia (Anexo D). El procedimiento se realiza en una cabina de flujo laminar horizontal en condiciones asépticas, teniendo en cuenta las normas de bioseguridad para laboratorios microbiológicos.
Para finalizar se inocula el microorganismo en un total de siete cajas de petri con caldo sabraud glucosado para contar con una cantidad suficiente.
- **Recuento del cultivo de *A. brasiliensis*:** se realiza la cuantificación de la concentración de esporas pasados 7 días de incubación. Para este recuento se utiliza la cámara de Neubauer, tween 80 como agente dispersante que “reacciona con las esporas separándolas unas de otras lo cual permite una mejor contabilización”⁶⁸, y azul de lactofenol a fin de llevar a cabo una tinción simple para facilitar la observación de los hongos a nivel microscópico. Procedimiento descrito en el Diagrama 2.

⁶⁸ CUERVO, Raúl, *et al.* Determinación de la factibilidad del hongo "Metarhizium anisopliae" para ser usado como control biológico de la hormiga arriera (*Atta cephalotes*). *Guillermo de Ockham: Revista científica*. 2008, vol. 6, nro. 1. pp. 91-98

Diagrama 2. Recuento del cultivo de *A. brasiliensis*



Fuente. Elaboración propia

La Tabla 4 reporta los resultados obtenidos del conteo de esporas en la cámara de Neubauer teniendo en cuenta 1 mL de dilución con 9 mL de agua destilada estéril para obtener un factor de dilución de 10^{-1}

Tabla 4. Recuento celular del cultivo *A. brasiliensis* (esporas)

NÚMERO DE CUADRANTE	RECUESTO DE ESPORAS	RÉPLICA DE RECUESTO DE ESPORAS
1	10	17
2	12	12
3	12	9
4	12	10
5	11	9
Suma	57	57

Fuente. Elaboración propia

Para el cálculo final de la concentración de esporas se usa la Ecuación 3, considerando los datos reportados en la Tabla 4.

Ecuación 3. Concentración de esporas

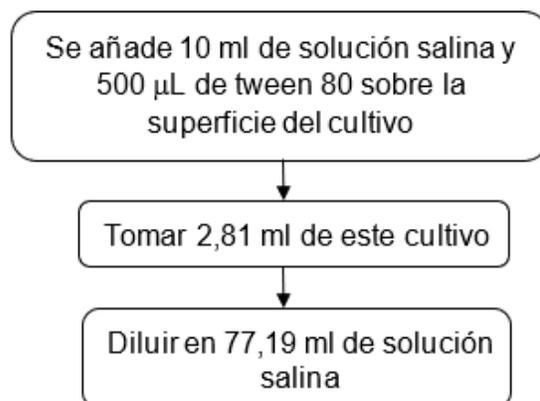
$$Esporas/mm^3 = \frac{\sum Esporas \times 1/fd}{1mm \times 1mm \times 0.1mm \times 5/25}$$

Fd: factor de dilución; 1mm: ancho del cuadrante; 1mm: largo del cuadrante; 0.1mm: profundidad del cuadrante; 5/25: cuadrante donde se realiza el conteo

Fuente. VÉLEZ, Patricia. POSADA, Francisco. MARIN, Patricia. GONZALEZ, María Teresa. OSORIO, Eduardo. BUSTILLO, Alex. Técnicas para el control de calidad de formulaciones de hongos entomopatógenos. Federación Nacional de Cafeteros de Colombia, Centro Nacional de Investigaciones de Café Pedro Uribe Mejía. CENICAFE, 1997. p. 9.

- **Acondicionamiento final para el inóculo *A. brasiliensis*:** debido a que se obtuvo una concentración de 28.5×10^6 esporas/mL se hace una dilución con 2,81 mL del cultivo en solución salina para ajustar a la concentración de 10^6 esporas/mL, de acuerdo con el Diagrama 3.

Diagrama 3. Acondicionamiento final para el inóculo *A. brasiliensis*



Fuente: Elaboración propia

2.3.2 Preparación del inóculo de lodo activo. Inicialmente se determina los sólidos secos totales del lodo activo, con el objetivo de conocer su concentración inicial (mg/L) ya que posterior a ello se ajusta la concentración a la especificada en la Tabla 3 (1000mg/L), procedimiento descrito en el Diagrama 4.

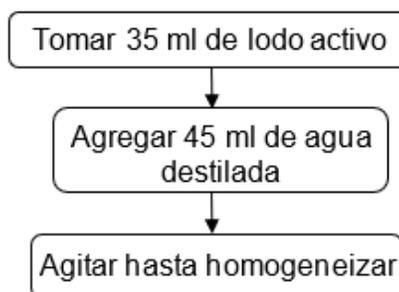
Diagrama 4. Determinación de sólidos secos de lodo activo



Fuente. Elaboración propia

Se obtiene una concentración inicial de 2286,666 mg/L por tal razón se hace una dilución para obtener una concentración final de 1000 mg/L, procedimiento descrito en el Diagrama 5.

Diagrama 5. Acondicionamiento final del lodo activo



Fuente. Elaboración propia

2.3.3 Preparación del inóculo de lodo activo bioaumentado un 10% con *A. brasiliensis*. Teniendo en cuenta que el bioaumento con *A. brasiliensis* al lodo activo es solo del 10% del total del volumen (80 mL) a cargar al biorreactor, se toma 8 mL de la solución de *A. brasiliensis* con concentración de 10^6 esporas/mL y 72 mL de lodo activo con concentración de 1000 mg/L, se cargan al biorreactor agitando hasta homogeneizar.

2.4 CARACTERÍSTICAS Y PREPARACIÓN DE MATERIAL DE ENSAYO

La norma ISO 14852:2018 presenta como sugerencia para el control positivo un polímero biodegradable bien definido como el filtro de celulosa y como control negativo un polímero no biodegradable como el HDPE, datos copilados en la Tabla 5, además establece que los materiales de ensayo deben estar en formas similares y la cantidad depende del tamaño del recipiente.

Tabla 5. Características de los materiales a evaluar

MUESTRAS	FORMULA QUÍMICA	USO
Celulosa (papel filtro)	$C_6H_{10}O_5$	Control positivo
Polietileno de alta densidad (HDPE).	$(C_2H_4)_n$	Control negativo
Ácido poliláctico.	$C_3H_4O_2$	Estudio experimental

Fuente. Elaboración propia

El material de ensayo está en forma de rectángulo con dimensiones de 2x3 cm, esto debido a que al finalizar la prueba de 27 días se realizaran pruebas en las que se necesita contar con un material sólido, además cada biorreactor contara con 2 g

aproximadamente de cada uno de estos materiales, cantidad suficiente puesto que por la baja densidad presenta un gran volumen.

2.5 PREPARACIÓN DE MUESTRAS PARA LOS BIORREACTORES

La prueba de biodegradación requiere un total de 18 biorreactores, cada uno de los tres tipos de inóculos debe tener una muestra en blanco, una muestra de celulosa (control positivo), una muestra de HDPE (control negativo) y tres muestras de PLA, dos de estas se presentan como réplicas, cumpliendo las especificaciones de la norma ISO 14852:2018, en la que se especifica que como mínimo se debe tener dos réplicas del material de prueba.

2.5.1 Muestra de blanco (inóculo solo). Se cargan los biorreactores con 80 mL de inóculo sin presencia de algún material de ensayo.

2.5.2 Muestra celulosa (control positivo). Se carga el biorreactor con 80 mL de inóculo, cada uno con 2 g aproximadamente de papel filtro con las especificaciones de tamaño anteriormente nombradas.

2.5.3 Muestra HDPE (control negativo). Se carga el biorreactor con 80 mL de inóculo, cada uno con 2 g aproximadamente de HDPE con las especificaciones de tamaño anteriormente nombradas.

2.5.4 Muestra PLA. Se carga el biorreactor con 80 mL de inóculo, cada uno con 2 g aproximadamente de PLA con las especificaciones de tamaño anteriormente nombradas.

2.6 VARIABLES DEL PROCESO

Se opera bajo las condiciones en las que los microorganismos están facultados para un mejor desarrollo, teniendo en cuenta que se trabaja con microorganismos mesófilos y aerobios.

2.6.1 Temperatura. La temperatura es diferente para cada especie microbiana en un proceso degradativo. Para fomentar el desarrollo de la colonización de los microorganismos mesófilos hacia las muestras, se trabaja en el rango de temperatura de 20°C – 25°C ($\pm 1^\circ\text{C}$) propuesto por la norma ISO 14852:2018⁶⁹. Para preservar el rango de temperatura de trabajo, se cuenta con un sistema compuesto por un recipiente de icopor que contiene y conserva agua a 25°C, esta temperatura se verifica diariamente.

⁶⁹ ISO. ISO 14852. Año 2018. Determination of the ultimate aerobic biodegradability of plastic materials in an aqueous medium — Method by analysis of evolved carbon dioxide.

2.6.2 pH. El valor del pH es un factor relevante para la supervivencia y actividad de los microorganismos. Se usa un valor mantenido a 7 ± 0.2 ⁷⁰propio de los medios salados por lo que el inóculo de *A. brasiliensis* fue diluido en una solución salina.

2.6.3 Flujo de aire. Se considera de magnitud 2 L/min en la entrada del divisor y correspondiendo a 0.11 L/min para cada recipiente para mantener las condiciones aeróbicas durante experimentación, esto de acuerdo a las recomendaciones contenidas en la investigación de Rodríguez Santoyo⁷¹ además se dispone de un rotámetro que fue previamente calibrado para conocer y controlar de forma apropiada el flujo. Por otro lado, la calidad del aire es fundamental pues una mayor pureza de aire alimentado en las unidades reactivas garantiza la oxidación de la materia y como consecuencia una adecuada generación de dióxido de carbono debido al proceso de respiración, por ese motivo el aire se alimenta desde un compresor que suministra un efluente filtrado y libre de grasa.

2.6.4 Concentración Iodo activado. Definido en la norma ISO 14852:2018⁷² a una concentración de 1000 mg/L.

2.6.5 Concentración *A. brasiliensis*. Concentración de 10^6 esporas /mL de acuerdo a lo reportado por Navinchara G. Shimpi⁷³.

Previo a cargar los inóculos con las respectivas muestras, se realiza una prueba con agua en los recipientes para cerciorarse de la inexistencia de fugas de aire y también con el objetivo de verificar la uniformidad de flujo en las corrientes de los recipientes con las trampas. También la longitud correcta de los tubos que alimentan el dióxido de carbono a las trampas, esto con el fin evitar el burbujeo.

⁷⁰ SHIMPI, Navinchandra G.; BORANE, Mahesh y MISHRA, Satyendra. Preparation, characterization, and biodegradation of PS:PLA and PS:PLA:OMMT nanocomposites using *Aspergillus niger*. *Polymer Composites*. 2014, vol. 35, nro. 2.

⁷¹ RODRÍGUEZ, Ángela. Desarrollo de una técnica alternativa de biodegradación en condiciones aerobias para el ácido poliláctico y mezcla PVA – almidón frente al polietileno en un medio sólido [En línea] Fundación Universidad de América, 2015. 104 p.

⁷² Determination of the ultimate aerobic biodegradability of plastic materials in an aqueous medium - Method by measuring the oxygen demand in a closed respirometer (ISO 14851:1999). (Oct). 2004.

⁷³ SHIMPI, Navinchandra G.; BORANE, Mahesh y MISHRA, Satyendra. Preparation, characterization, and biodegradation of PS:PLA and PS:PLA:OMMT nanocomposites using *Aspergillus niger*. *Polymer Composites*. 2014, vol. 35, nro. 2.

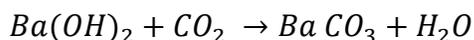
3. ANÁLISIS Y RESULTADOS

En este capítulo se realiza el análisis de los resultados de la técnica de biodegradación que se llevó a cabo durante un tiempo total de 27 días. Se determinó la biodegradación del empaque plástico comercial de PLA por el método de porcentaje de biodegradación y pérdida de masa como análisis alterno, datos que, mediante ecuaciones matemáticas, análisis y programas generan gráficas y tablas que se muestran en el desarrollo de este capítulo. Por otro lado, se recurre al uso de técnicas analíticas (SEM y FTIR), estudiando el PLA en sus cambios químicos y morfológicos, los resultados de estas dos técnicas serán suficientes para la comparación en el desempeño de los tres diferentes inóculos.

3.1 CANTIDAD DE DIÓXIDO DE CARBONO

Debido a las reacciones que se llevan a cabo tanto en las trampas de dióxido de carbono (Ecuación 4) como en el proceso de titulación (Ecuación 5) es posible calcular los gramos de dióxido de carbono generado por muestra y por ende el porcentaje de biodegradación.

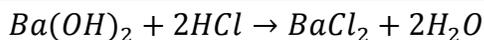
Ecuación 4. Reacción en la solución de hidróxido de bario (trampa de CO₂)



Fuente. Elaboración propia basado en Rodríguez, Ángela. Desarrollo de una técnica alternativa de biodegradación en condiciones aerobias para el ácido poliláctico y mezcla PVA – Almidón frente al polietileno en un medio sólido [en línea] Fundación Universidad de América, 2015

El carbonato de bario (Ba CO₃) es insoluble y se precipita en la solución acuosa.

Ecuación 5. Reacción en la titulación con ácido clorhídrico y fenolftaleína



Fuente. Elaboración propia basado en Rodríguez, Ángela. Desarrollo de una técnica alternativa de biodegradación en condiciones aerobias para el ácido poliláctico y mezcla PVA – Almidón frente al polietileno en un medio sólido [en línea] Fundación Universidad de América, 2015

Mediante relaciones estequiométricas se puede determinar la cantidad de dióxido de carbono que emite diariamente cada una de las muestras. Con la ecuación 6 se obtiene las mmoles de hidróxido de bario en el proceso de titulación y a través de la ecuación 7 se precisa las mmoles iniciales pues serán destinadas en el cálculo de las mmoles de dióxido de carbono.

Ecuación 6. mmoles de hidróxido de bario en el proceso de titulación

$$mmoles Ba(OH)_2 = mL HCl \times \frac{Concentración\ mmoles\ HCl}{1mL\ HCl} \times \frac{1\ mmol\ de\ Ba(OH)_2}{2\ mmoles\ HCl}$$

Fuente. Elaboración propia basado en Rodríguez, Ángela. Desarrollo de una técnica alternativa de biodegradación en condiciones aerobias para el ácido poliláctico y mezcla PVA – Almidón frente al polietileno en un medio sólido [en línea] Fundación Universidad de América, 2015

Ecuación 7. mmoles iniciales hidróxido de bario

$$mmoles\ iniciales\ Ba(OH)_2 = \frac{Concentración\ mmoles\ Ba(OH)_2}{1mL\ Ba(OH)_2} \times mL\ Ba(OH)_2$$

Fuente. Elaboración propia basado en Rodríguez, Ángela. Desarrollo de una técnica alternativa de biodegradación en condiciones aerobias para el ácido poliláctico y mezcla PVA – Almidón frente al polietileno en un medio sólido [en línea] Fundación Universidad de América, 2015

La reacción en la solución de hidróxido de bario (Ecuación 4) tiene una relación de 1:1, un mol de Ba (OH)₂ reacciona con un mol de CO₂, por tal razón la cantidad de dióxido de carbono se puede calcular según la ecuación 7, y en gramos de acuerdo con la ecuación 8. Los datos se muestran en el Anexo E.

Ecuación 8. mmoles iniciales de hidróxido de bario

$$mmoles\ CO_2 = mmoles\ iniciales\ Ba(OH)_2 - \frac{mmoles\ HCl}{2}$$

Fuente. Elaboración propia basado en Rodríguez, Ángela. Desarrollo de una técnica alternativa de biodegradación en condiciones aerobias para el ácido poliláctico y mezcla PVA – Almidón frente al polietileno en un medio sólido [en línea] Fundación Universidad de América, 2015

Ecuación 9. Gramos de dióxido de carbono

$$g\ de\ CO_2 = mmoles\ CO_2 \times \frac{44mg}{1mmol} \times \frac{1}{1000mg}$$

Fuente. Elaboración propia basado en Rodríguez, Ángela. Desarrollo de una técnica alternativa de biodegradación en condiciones aerobias para el ácido poliláctico y mezcla PVA – Almidón frente al polietileno en un medio sólido [en línea] Fundación Universidad de América, 2015

3.2 PORCENTAJE DE BIODEGRADACIÓN

El cálculo del porcentaje de biodegradación se mide mediante la relación entre el dióxido de carbono generado por el material de ensayo y la cantidad teórica máxima de dióxido de carbono que puede producir el material de ensayo.

Mediante la diferencia entre la cantidad acumulada de dióxido de carbono generado por los biorreactores que constan del inóculo y material de ensayo y la cantidad acumulada de dióxido de carbono generado por la muestra de blanco (inóculo solo) se calcula el dióxido de carbono generado por el material de ensayo, anteriormente nombrado, llegando al cálculo del porcentaje de biodegradación de cada material de ensayo que se determina por la Ecuación 9.

Ecuación 10. Porcentaje de biodegradación

$$\% \text{ de biodegradación} = \frac{\sum(CO_2)_T - \sum(CO_2)_B}{ThCO_2} \times 100$$

Fuente. ISO 14852. Año 2018. Determination of the ultimate aerobic biodegradability of plastic materials in an aqueous medium — Method by analysis of evolved carbon dioxide.

Donde:

$\sum(CO_2)_T$: cantidad acumulada de dióxido de carbono, en gramos generado por cada una de las muestras entre el tiempo de inicio y el tiempo de la prueba.

$\sum(CO_2)_B$: cantidad acumulada de dióxido de carbono, en gramos generado por las muestras en blanco entre el tiempo de inicio y el tiempo de la prueba.

$ThCO_2$: cantidad teórica de dióxido de carbono que puede producir el material de ensayo (g)

3.2.1 Carbono orgánico total (TOC) Es la cantidad de carbono en un compuesto orgánico, en la Tabla 6 se muestra el % TOC para el material de ensayo.

Tabla 6. Carbono orgánico total para los materiales de ensayo

MATERIAL DE ENSAYO	%TOC
Celulosa	44%
HDPE	85%
PLA	50%

Fuente. Elaboración propia.

3.2.2 Cantidad teórica de carbono generado. Cantidad máxima teórica de dióxido de carbono generado después de la oxidación completa del material, calculado a partir de su fórmula molecular. Partiendo de datos de sólidos secos de cada uno de

los materiales de ensayos y carbono orgánico total se calculó la cantidad teórica de carbono en gramos, utilizando la Ecuación 11.

Ecuación 11. Cantidad teórica de Carbono generado

$$ThCO_2 = (m)(X_c) \left(\frac{44}{12} \right)$$

Fuente. ISO 14852. Año 2018. Determination of the ultimate aerobic biodegradability of plastic materials in an aqueous medium — Method by analysis of evolved carbon dioxide.

Donde

m : masa de la sustancia de prueba introducida en el sistema de prueba

X_c : contenido de carbono de la sustancia de prueba, determinado a partir de la fórmula empírica.

44/12: masa molecular del dióxido de carbono y masa atómica del carbono respectivamente

En la Tabla 7 se muestran los resultados

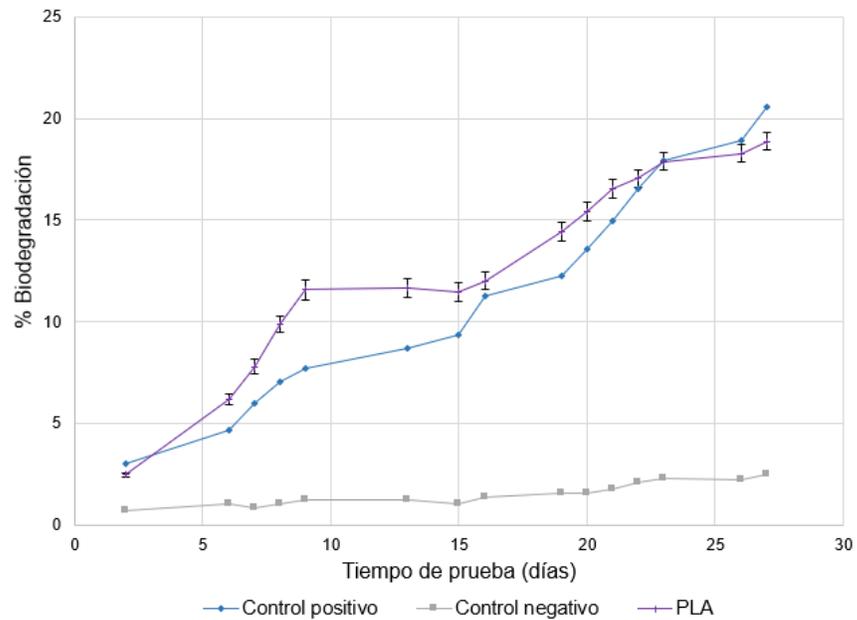
Tabla 7. Cantidad teórica de carbono generado por el material de ensayo.

MATERIAL DE ENSAYO	ThCO ₂ (g)
Celulosa	0,327
HDPE	0,630
PLA	0,368

Fuente. Elaboración propia.

La Gráfica 1, Gráfica 2 y Gráfica 3 ,corresponden al porcentaje de biodegradación del control positivo, negativo y material de prueba PLA en cada uno de los inóculos, se espera que la respuesta del proceso de biodegradación sea que el porcentaje de biodegradación del control positivo sea mayor que el PLA y el negativo menor que el PLA, comportamiento que se confirma con la tesis titulada “Desarrollo de una técnica alternativa de biodegradación en condiciones aerobias para el ácido poliláctico y mezcla PVA – almidón frente al polietileno en un medio sólido” desarrollada por Ángela Rodríguez, donde el porcentaje de biodegradación para el control positivo es de 71,53% ,PLA 34,16% y control negativo 12,55% para un tiempo de prueba de 46 días.

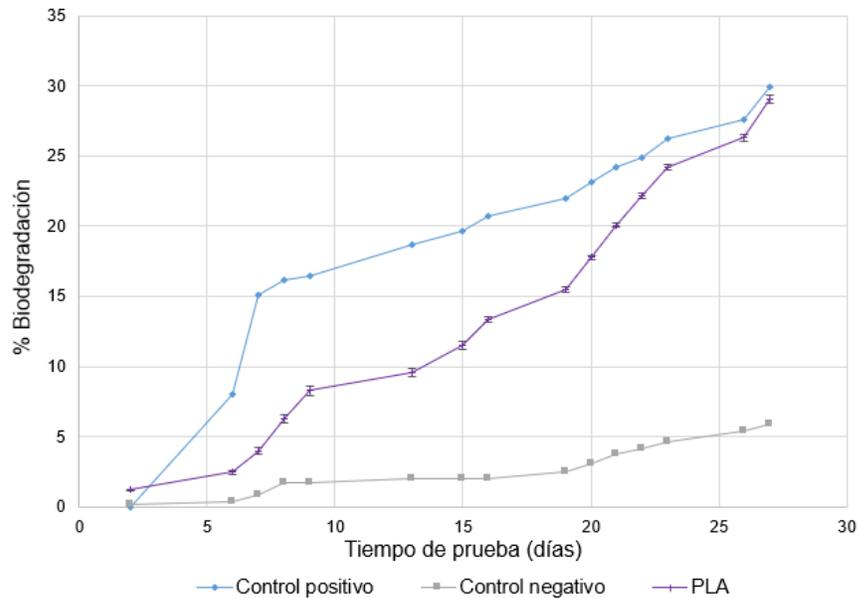
Gráfica 1. Porcentaje de biodegradación en el inóculo de *A. brasiliensis*



Fuente. Elaboración propia.

La Gráfica 1 valida el correcto proceso de biodegradación para el inóculo de *A. brasiliensis*, como resultados finales se obtuvo que el porcentaje de biodegradación para control positivo es 20,59%, PLA a 18,87% y control negativo a 2,49%.

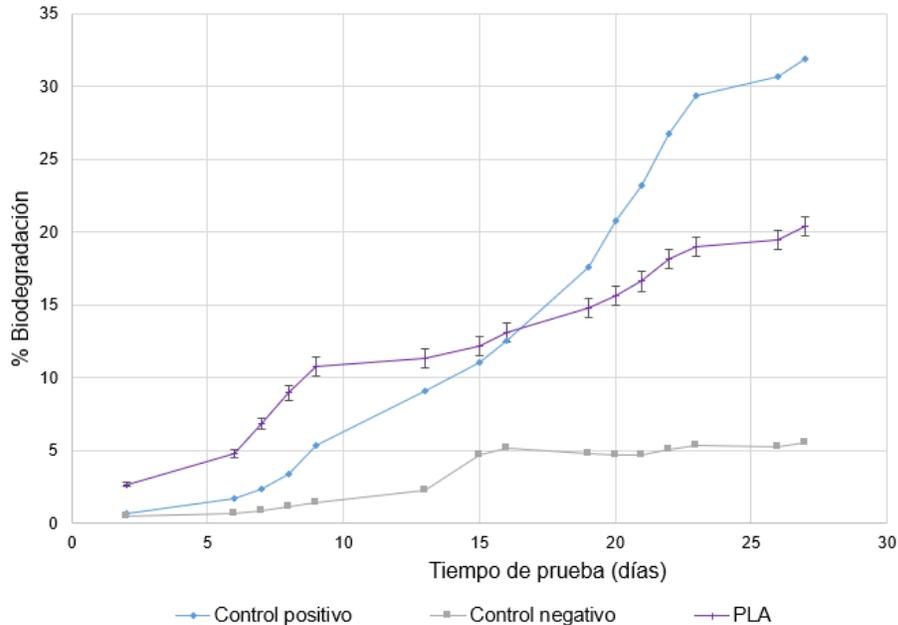
Gráfica 2. Porcentaje de biodegradación en el inóculo de lodo activo



Fuente. Elaboración propia.

La Gráfica 2 valida el correcto proceso de biodegradación para el inóculo de lodo activo, como resultados finales se obtuvo que el porcentaje de biodegradación para control positivo es 29,95%, PLA a 29,02% y control negativo a 5,89%.

Gráfica 3. Porcentaje de biodegradación en el inóculo de lodo activo bioaumentado un 10% con *A. brasiliensis*



Fuente. Elaboración propia.

La Gráfica 3 valida el correcto proceso de biodegradación para el inóculo de lodo activo bioaumentado un 10% con *A. brasiliensis*, como resultados finales se obtuvo que el porcentaje de biodegradación para el control positivo es 31,88%, PLA a 20,41% y control negativo a 5,51%.

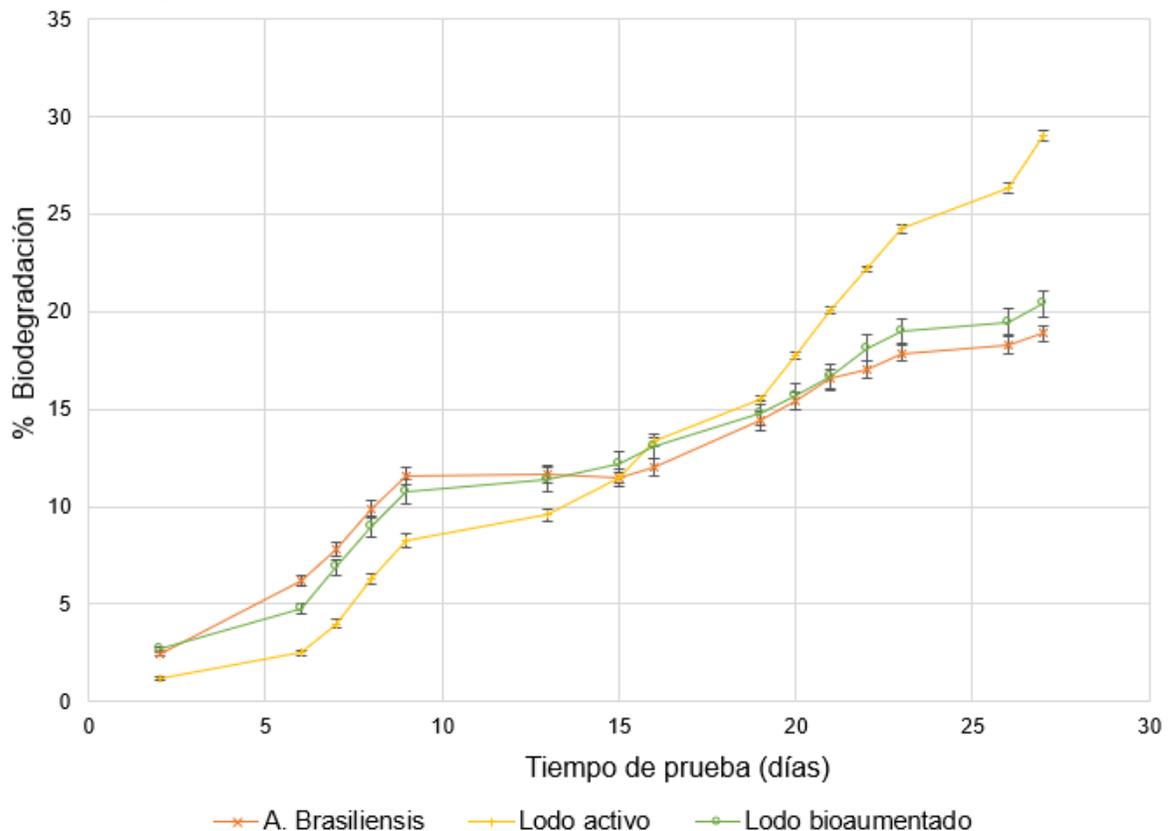
Analizando los anteriores resultados se evidencia en el porcentaje de biodegradación del inóculo de lodo activo y lodo activo bioaumentado un 10% con *A. brasiliensis* que el control negativo tiene un porcentaje de biodegradación mayor al 5% y el inóculo *A. brasiliensis* de 2,49%, esta diferencia es debido a que el lodo activo contiene materia orgánica que se está biodegradando, incrementando la generación de dióxido de carbono para las muestras de HDPE.

Por otra parte, se afirma que el empaque plástico comercial de PLA tiene tendencia a la biodegradabilidad en presencia de inóculos de lodo activo, *A. brasiliensis* y lodo activo bioaumentado un 10% con *A. brasiliensis* en un medio acuoso aerobio. Ángela Rodríguez en el desarrollo de su tesis confirma la biodegradabilidad del PLA, al día 27 de dar inicio a su prueba, el porcentaje de biodegradación para el control positivo es de 51,93%, PLA 31,05% y control negativo 7,64%, validando el correcto

proceso de biodegradación, por otro lado se evidencia que el compostaje es la mejor opción como inóculo para el proceso de biodegradación del PLA, al día 27 el porcentaje de biodegradación en compostaje es mayor que algún porcentaje de biodegradación de PLA en los inóculos de esta prueba, esto debido a que puede contener mayor población de microorganismo con enzimas disponibles que potencializan la actividad biodegradativa, confirmando la compostabilidad del PLA.

Teniendo en cuenta que el empaque plástico comercial de PLA tiene una respuesta positiva frente al procesos de biodegradación, la Gráfica 4 tiene como fin la comparación del desempeño de *A. brasiliensis*, lodo activo y lodo activo bioaumentado un 10% con *A. brasiliensis* en el proceso de biodegradación del PLA

Gráfica 4. Porcentaje de biodegradación del PLA en los inóculos de *A. brasiliensis*, lodo activo y lodo activo bioaumentado un 10% con *A. brasiliensis*



Fuente. Elaboración propia.

Se observa en la Gráfica 4 la evolución del proceso de biodegradación del PLA en términos de porcentaje de biodegradación en los tres diferentes inóculos en un tiempo total de 27 días.

La Gráfica 4 presenta dos zonas, la primera zona va al dar inicio al proceso de biodegradación hasta el día 16, se evidencia en ese intervalo de tiempo un cambio

continuo en el comportamiento de porcentajes de biodegradación en los tres inóculos, la segunda zona inicia el día 19 hasta el día 27, el inóculo que presenta un desempeño en pro al proceso de biodegradación es el lodo activo, iniciando el día 19 con un porcentaje de biodegradación de 15,47%, seguido del inóculo de lodo activo bioaumentado un 10% con *A. brasiliensis* con 14,80% y por último el *A. brasiliensis* con 14,41%, este comportamiento se mantiene constante hasta dar por finalizada la prueba en el día 27, con un porcentaje de biodegradación para el lodo activo de 29,02%, seguido del lodo activo bioaumentado un 10% con *A. brasiliensis* con 20,41% y por último el *A. brasiliensis* con 18,87% siendo este el inóculo con el más bajo desempeño para la biodegradación de PLA.

Mediante la caracterización del lodo activado proveniente de la PTAR Funza realizada por VASQUEZ ALEMAN Juan 2018 en el Anexo I, donde se encontraron metales como As, Cd, Zn, Cu, Cr, Hg, Ni, Pb, los cuales son tóxicos cuando se encuentran a concentraciones relativamente elevadas "afectando casi todos los aspectos del metabolismo, crecimiento y desarrollo de hongos, dependiendo del grupo taxonómico y de la especiación"⁷⁴. Cu y Ni tienen valores de 457 ppm y 357 ppm respectivamente. Los cuales están por encima de la concentración mínima inhibitoria (CMI), de acuerdo a lo reportado por AKHTAR Shazia 2013 en el Anexo J, comprobando la disminución de la actividad del hongo. Además, la microbiota típica de los lodos contiene bacterias, siendo los constituyentes más abundantes⁷⁵ y de forma antagónica a los hongos, "son los principales responsables de la remoción de nutrientes orgánicos en las aguas residuales"⁷⁶. Por lo que en el bioaumentado el lodo limita la mezcla y los procesos de respiración aerobio para *A. brasiliensis*.

Mediante estos resultados se puede analizar que al darse una situación de un bioaumentado mayor al 10% con este microorganismo en específico el desempeño del lodo activo como inóculo se verá afectado negativamente, el porcentaje de biodegradación disminuirá en más del 6% como en este caso.

⁷⁴ GARCIA HERNANDEZ, Marisela. Aislamiento e identificación de hongos filamentosos tolerantes a metales pesados en el proceso de lodos activados en una planta de tratamiento de agua residual. Universidad Autónoma de Nuevo León, 2004. 3 p.

⁷⁵ MOELLER, Gabriela. TOMASINI, Ana Cecilia. Microbiología de lodos activados. Memorias curso internacional de sistemas integrados de tratamiento de aguas residuales y su reúso para un medio ambiente sustentable. Instituto Mexicano de Tecnología del Agua (IMTA). 2004. Disponible en: <http://documentacion.ideam.gov.co/openbiblio/bvirtual/018834/MEMORIAS2004/CapituloII/5Microbiologiadelodosactivados.pdf>.

⁷⁶ THEOBALD, Dan. Microorganisms in activated sludge. [En línea]. Junio 2014 [12 de febrero de 2020] En: Water Technology and Industrial Water World. Disponible en: <https://www.watertechonline.com/wastewater/article/15545467/microorganisms-in-activated-sludge>

A partir de los resultados, se reconoce que con un solo microorganismo en específico como el *A. brasiliensis* se dificultan los procesos de biodegradación para empaques de PLA, al contrario del lodo activo que dispone de múltiples microorganismos para hacer la transformación de materia orgánica biodegradable en CO₂ y otros compuestos, donde se potencializa la actividad degradativa como en la composta.

3.3 PÉRDIDA DE MASA DE MATERIAL DE ENSAYO

Un análisis alterno al porcentaje de biodegradación por generación de dióxido de carbono es la pérdida de masa que presenta el material en un proceso degradativo de 27 días.

En la Tabla 8 se muestra el porcentaje de pérdida de masa de cada uno de los materiales de ensayo, resultado en base a datos del Anexo K.

Tabla 8. Porcentaje de pérdida de masa de las muestras

TIPO DE INÓCULO	% PÉRDIDA DE MASA	
<i>A. brasiliensis</i>	Celulosa	11,15
	HDPE	0,94
	PLA	5,90
	PLA (réplica #1)	5,43
	PLA (réplica #2)	5,42
	PLA(Promedio)	5,59
Lodo activo	Celulosa	15,52
	HDPE	1,04
	PLA	6,36
	PLA (réplica #1)	6,14
	PLA (réplica #2)	6,92
	PLA(Promedio)	6,47
Lodo activo bioaumentado un 10% con <i>A. brasiliensis</i>	Celulosa	11,26
	HDPE	1,01
	PLA	6,77
	PLA (réplica #1)	4,39
	PLA (réplica #2)	5,32
	PLA(Promedio)	5,50

Fuente. Elaboración propia.

De acuerdo con los resultados de la Tabla 8 y teniendo como referencia la tesis titulada “Desarrollo de una técnica alternativa de biodegradación en condiciones aerobias para el ácido poliláctico y mezcla PVA – almidón frente al polietileno en un medio sólido”, desarrollada por Ángela Rodríguez, se valida el correcto proceso de biodegradación, los controles positivos de los tres diferentes inóculos tienen un porcentaje de pérdida de masa mayor que el del PLA y los controles negativos tienen un porcentaje de pérdida de masa menor que el del PLA, resultados que

tienen coherencia con el análisis de porcentaje de biodegradación, esto debido a que con un mayor porcentaje de pérdida de masa hay un porcentaje de biodegradación mayor.

Este fenómeno se da lugar puesto que el material está en condiciones degradativas donde sus moléculas orgánicas están siendo transformadas por el inóculo en CO₂, el material de ensayo presenta cambios químicos y físicos, en este caso el cambio físico es perceptible por el cambio de masa que disminuye.

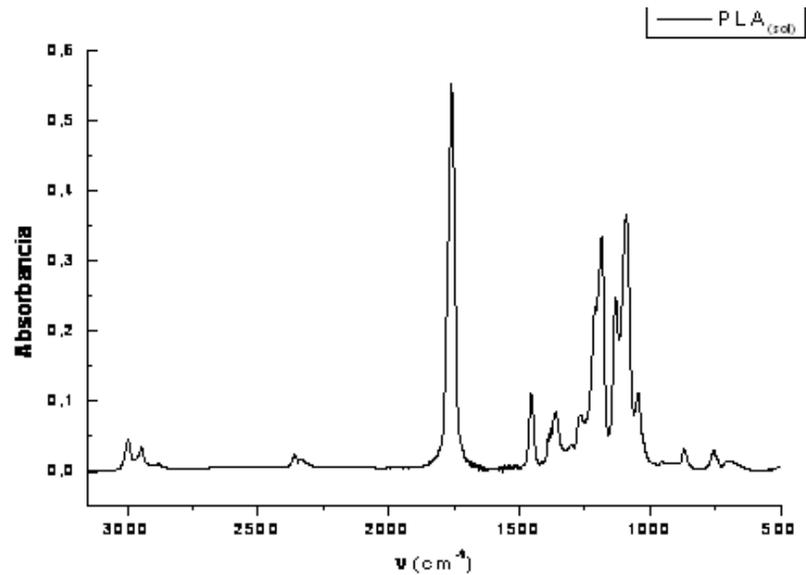
Por otro lado, se compara el desempeño de los tres diferentes inóculos en el proceso de biodegradación para el empaque plástico comercial de PLA, el lodo activo tiene en promedio el mayor porcentaje de pérdida de masa con 6,47% con una desviación estándar del 32,65%, resultado que concuerda con el análisis de porcentaje de biodegradación, seguido del inóculo *A. brasiliensis* que tiene en promedio una pérdida de masa de 5,59% con desviación estándar de 22,42% y por último el lodo activo bioaumentado un 10% con *A. brasiliensis* de 5,5% con una desviación de 97,85%, este último debería tener un mayor porcentaje en pérdida de masa de acuerdo a los resultados del porcentaje de biodegradación, esta falla en el resultado se debe a su alta desviación que determina este dato como no confiable.

La desviación en el porcentaje de pérdida de masa es a causa de la contaminación del material de prueba con pequeñas partículas sólidas del microorganismo que fueron imposibles de remover, esto influye en la exactitud de la medida de la masa.

3.4 ELECTROSCOPIO DE TRANSMISIÓN DE INFRARROJO POR TRANSFORMADA DE FOURIER (FTIR)

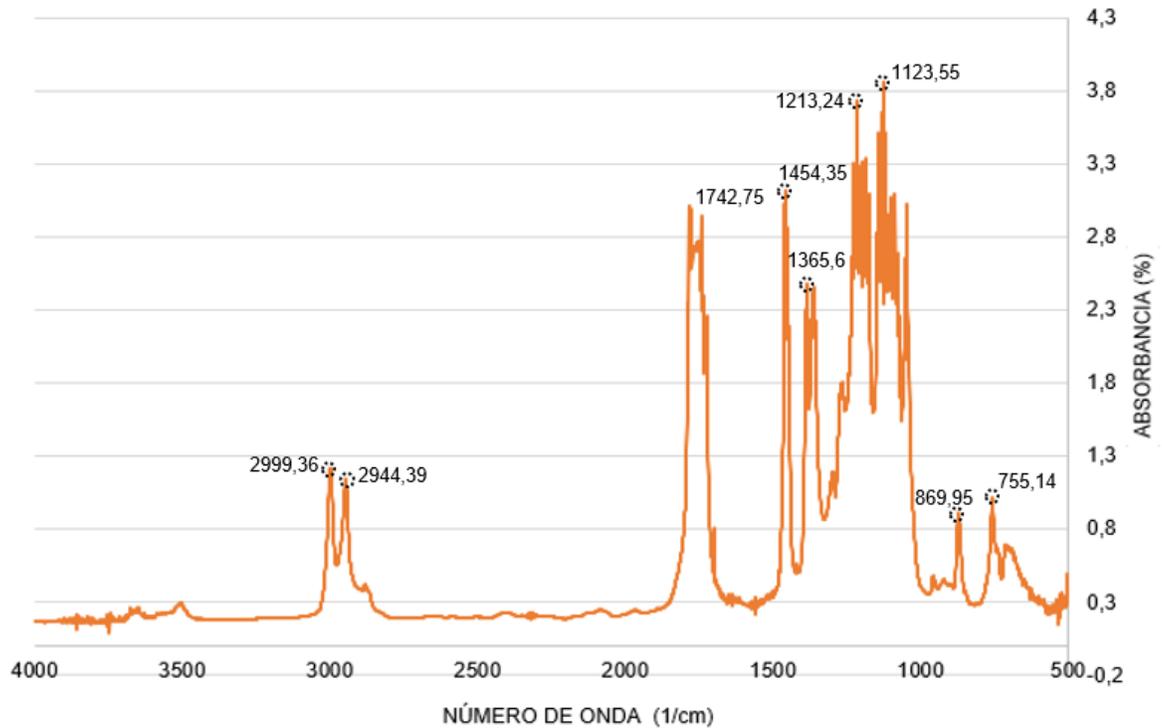
Mediante esta técnica analítica realizada en la Universidad Nacional de Colombia-Sede Bogotá en el laboratorio de Ingeniería Química; se identifican los cambios químicos en el empaque plástico comercial de PLA después de haber pasado por el proceso biodegradativo de 27 días, mediante la Gráfica 6, Gráfica 7 y Gráfica 8 se analizan los cambios en el porcentaje de absorbancia que debe ir en acuerdo con el porcentaje de biodegradación, quiere decir que a un mayor porcentaje de biodegradación del PLA un menor porcentaje de absorbancia, teniendo en cuenta que las bandas deben estar presentes en el número de onda característico del PLA como se muestra en la Gráfica 5.

Gráfica 5. FTIR referencia del PLA



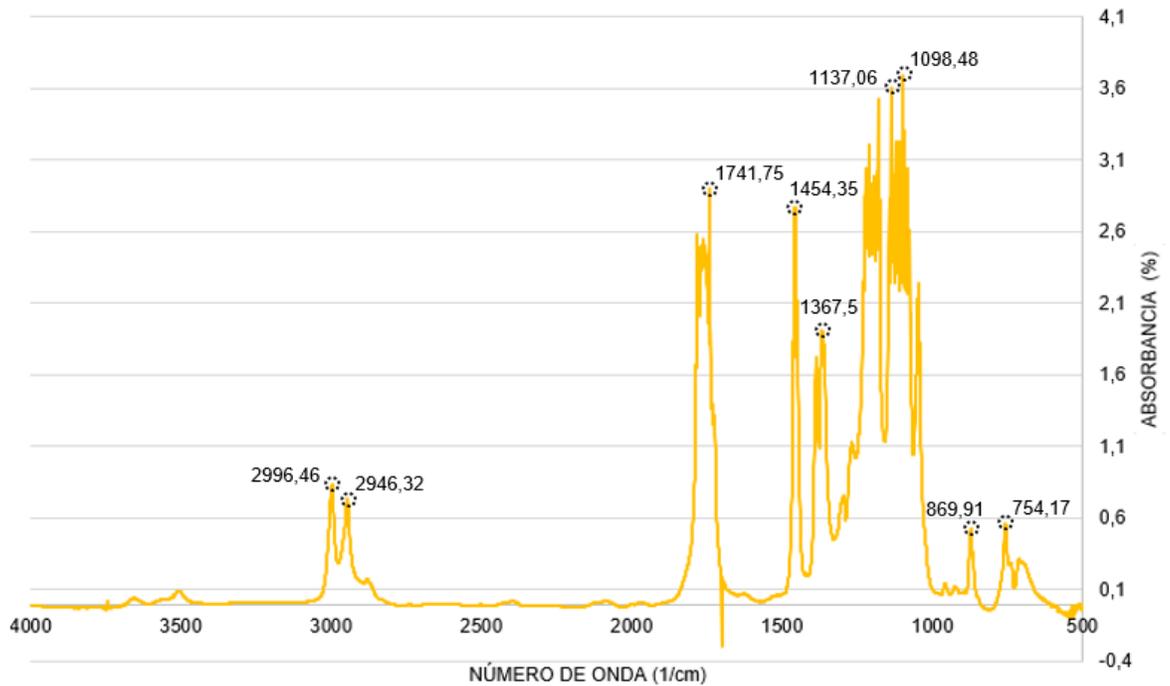
Fuente. SEGURA GONZALES, EDWIN ARIEL. Caracterización de materiales nanocompuestos basados en poli (ácido poliláctico) y nanopartículas de sílice.

Gráfica 6. FTIR del PLA en el inóculo de *A. brasiliensis*



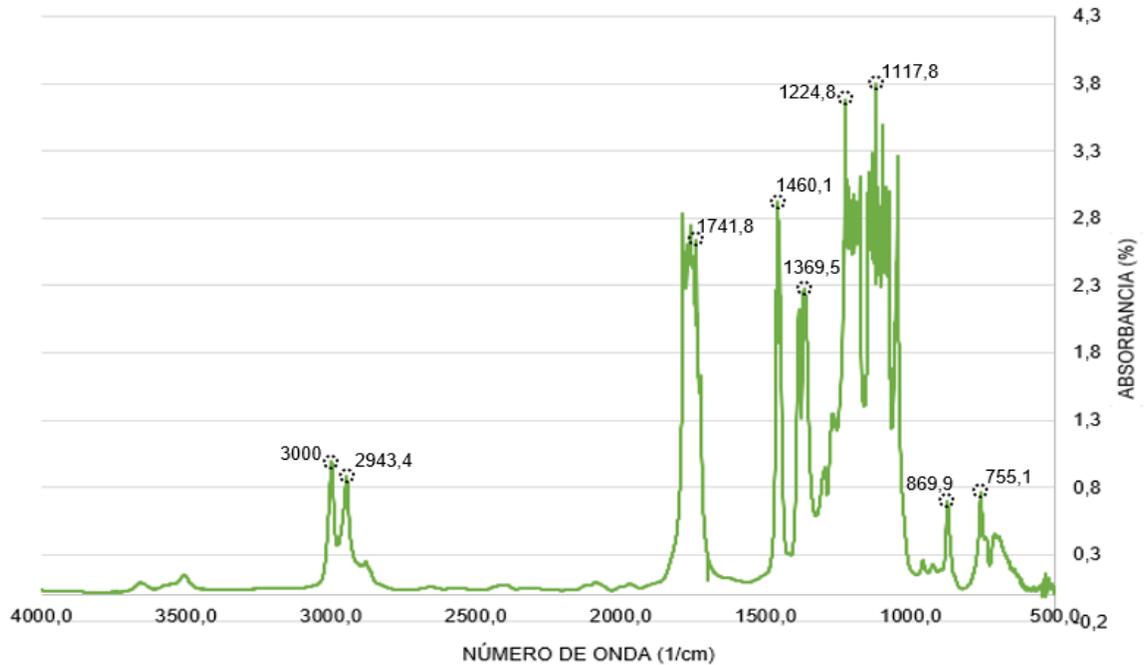
Fuente. Elaboración propia.

Gráfica 7. FTIR del PLA en el inóculo de lodo activo



Fuente. Elaboración propia.

Gráfica 8. FTIR del PLA en el inóculo de lodo activo bioaumentado un 10% con *A. brasiliensis*



Fuente. Elaboración propia.

Mediante la Gráfica 6, Gráfica 7 y Gráfica 8, se evidencia que la muestra de PLA genera bandas en un mismo rango de número de onda como la Gráfica 5 de referencia, el primer enlace de estiramiento C-H se encuentra en un rango de 3000-2800 cm^{-1} , el primer enlace carbonilo se encuentra en un rango de 1800-1500 cm^{-1} , el segundo y tercer enlace C-H se encuentran en un número de onda específica respectivamente 1460 cm^{-1} siendo esta banda fuerte y 1380 cm^{-1} siendo esta banda débil, el enlace éster se encuentra con dos bandas, una de mayor intensidad en un rango de 1300-1050 cm^{-1} , el cuarto enlace C-H se encuentra en un rango de 960-830 cm^{-1} que corresponde al grupo metilo y por último el segundo enlace carbonilo en un número de onda de 757 cm^{-1} , este resultado es característico de los grupos funcionales del PLA como se observa en la Tabla 9, lo cual no debe presentar un cambio en un proceso degradativo.

Tabla 9. Datos del FTIR del ácido poliláctico (PLA) de referencia

NÚMERO DE ONDA (cm^{-1})	BANDA	DEFORMACIÓN
2999;2946;2881	Enlace C-H	Deformación del C-H
1759	Enlace carbonilo	Vibración de tensión C=O
1456	Enlace C-H	Deformación asimétrica de C-H
1361	Enlace C-H	Deformación simétrica de C-H
1185;1132;1092;1046	Enlace éster	Vibración de tensión C-O
955;870	Enlace C-H	Vibración de tensión C-H
757	Enlace carbonilo	Vibración de tensión C=O

Fuente. Elaboración propia basado en SEGURA GONZALES, EDWIN ARIEL. Caracterización de materiales nanocompuestos basados en poli (Ácido poliláctico) y nanopartículas de sílice.

Tabla 10. Datos del FTIR del PLA en los tres tipos de inóculo

BANDA	NÚMERO DE ONDA (cm ⁻¹)	% ABSORBANCIA		
		1	2	3
Enlace C-H	2999,36;2943,4	1,17;1,13	0,83;0,73	0,93;0,83
Enlace carbonilo	1741,8	2,95	2,89	2,64
Enlace C-H	1460,1	3,12	2,76	2,93
Enlace C-H	1369,5	2,41	1,91	2,25
Enlace éster	1117,8;1224,8	3,86;3,73	3,69;3,6	3,8;3,68
Enlace C-H	869,9	0,85	0,49	0,66
Enlace carbonilo	754,2	0,98	0,53	0,73

1: *A. brasiliensis*; 2: lodo activo; 3: lodo activo bioaumentado un 10% con *A. brasiliensis*

Fuente. Elaboración propia.

Para la comparación del desempeño de los tres inóculos de prueba se analiza el porcentaje de absorbancia de cada una de las bandas, ya que el número de onda no debe presentar diferencias, como se confirma con el artículo titulado "Characterization of polylactic acid (PLA) / kenaf composite degradation by immobilized mycelia of *Pleurotus ostreatus*" desarrollada por Asep Hidayat y Sanro Tachibana, presentan los resultados de la degradación del PLA después de 1,2,3 y 6 meses mediante una gráfica de FTIR, se observa que no hay cambios en las posiciones de las bandas en los números de onda pero sí hay cambios en el porcentaje de transmitancia siendo cada vez menor al pasar los meses.

La relación entre el porcentaje de biodegradación con el porcentaje de absorbancia que se encuentra en la Tabla 10 se cumple, el inóculo de lodo activo tiene porcentajes de absorbancia menores que el de lodo activo bioaumentado al 10% con *A. brasiliensis* y *A. brasiliensis*, para todos los tipos de bandas.

El PLA contiene varios grupos funcionales, ácidos carboxílicos, ésteres y enlaces C-H, el grupo que se ve menos afectado de acuerdo con la tabla 14 es el enlace C-H que se encuentra en el número de onda 1460,1 cm⁻¹ y los dos enlaces éster, este último no se ve afectado puesto que es el enlace que une las moléculas de ácido láctico para conformar el polímero, estructura base, no es un enlace fácil de degradar como los enlaces C-H y enlaces carbonilo.

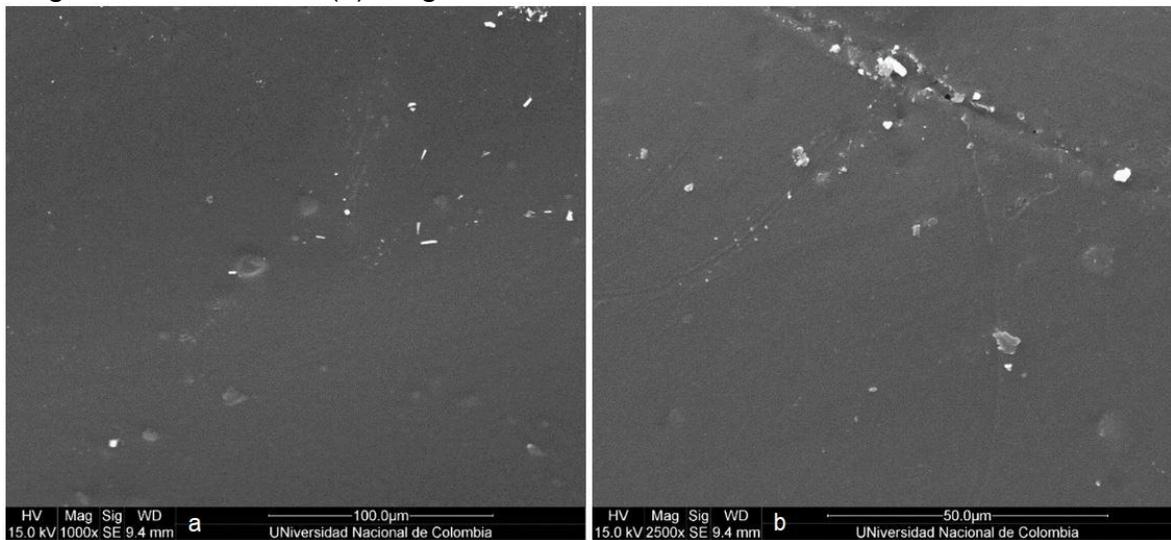
Este comportamiento se da a lugar debido a que las moléculas del PLA están siendo sujetas a una degradación, están siendo eliminadas y transformadas y al tener una

menor cantidad de grupos funcionales la absorción de radiación va a ser mucho menor en un número de onda en específico.

3.5 MICROSCOPIA ELECTRÓNICA DE BARRIDO (SEM).

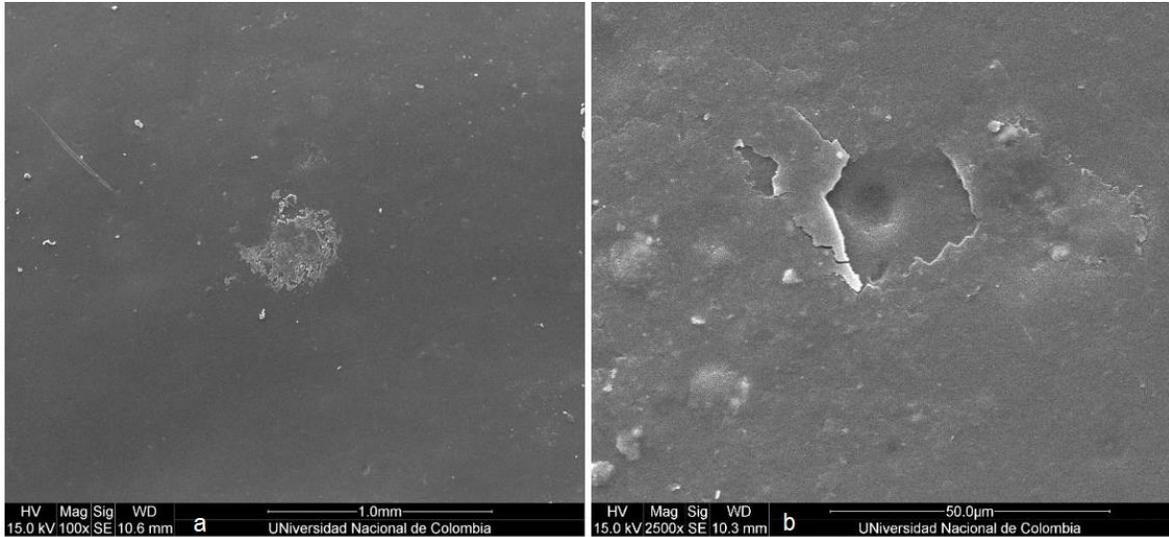
Se indagaron los cambios morfológicos superficiales del ácido poliláctico por microscopía electrónica de barrido (SEM) en el proceso degradativo por sometimiento a agentes biológicos durante 27 días, prueba realizada en la Universidad Nacional de Colombia- Sede Bogotá, en el laboratorio de Geociencias.

Figura 9. Microscopía electrónica de barrido para película de PLA sometido a inóculo de *A. brasiliensis*. Aceleración de voltaje 15 kV, resolución 9.4 mm (a) magnificación a 1000x (b) magnificación a 2500x



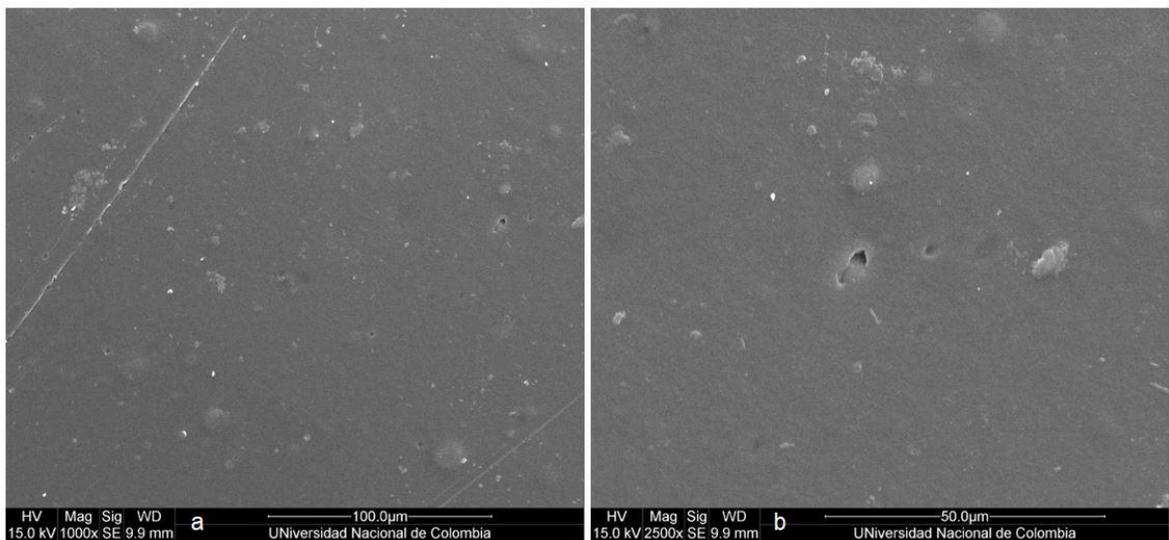
Fuente. Elaboración propia.

Figura 10. Microscopía electrónica de barrido para película de PLA sometido a inóculo de lodo activo. Aceleración de voltaje 15 kV (a) magnificación a 100x, resolución 10.6 mm (b) magnificación a 2500x, resolución 10.3 mm.



Fuente. Elaboración propia.

Figura 11. Microscopía electrónica de barrido para película de PLA sometida a inóculo de lodo activo bioaumentado al 10% con *A. brasiliensis*. Aceleración de voltaje 15 kV resolución 9.9 mm (a) magnificación 1000x (b) magnifica



Fuente. Elaboración propia.

En la Figura 7 (a) se puede ver la aparición de diversos filamentos en diferentes presentaciones dispuestos a lo largo de la superficie del material que se pueden asociar al manifiesto de hongos filamentosos, particularmente *A. brasiliensis* en el proceso de consumo del material como fuente de carbono y energía. La perforación que se observa en la Figura 7 (b) evidencia la presencia de proteínas liberadas por los hongos, que se ligaron a la superficie⁷⁷ del PLA. En la Figura 8 (a-b) se pueden observar algunos restos de lodo adheridos a la superficie del material que al retirar las muestras del recipiente y dejarlas secar, se convirtieron en sólidos con apariencia cristalina⁷⁸. Debido al ataque microbiano, el material tomó un aspecto no uniforme y comenzó a mostrar cierta irregularidad por la formación de algunos poros bien definidos con escamas en la periferia de los mismos resultando en una superficie rugosa de PLA provocando principios de fragmentación. Al igual que en el caso del lodo activado, lo que se percibe del PLA en el proceso con lodo activado bioaumentado al 10% con *A. brasiliensis* son residuos adheridos en el área analizada de la película y múltiples poros atribuidos a la actividad microbiana del inóculo, disímil en definición pues como se puede notar en la Figura 9 (a-b) estas marcas son menos profundas. Estas evidencias podrían indicar que el perfil de degradación del PLA se inició con la desintegración / fragmentación y luego la degradación en la superficie⁷⁹. Estos resultados se correlacionan bien con la pérdida de peso y el porcentaje de biodegradación previamente analizado, y con la alteración física del compuesto PLA.

Las imágenes de SEM generadas en la investigación de Navinchandra G. Shimpi⁸⁰ muestran la apariencia del compuesto PS:PLA tras el ensayo de biodegradación con *Aspergillus niger* durante 28 días en las que se aprecia con alta resolución esporas de hongos bien definidos creciendo en el material y quebrando las cadenas poliméricas, a diferencia de las imágenes generadas para esta investigación en las que la colonización no parece tan abundante. Se especula que una posible causa es el rango inferior de temperatura con el que se realizó el ensayo pues es una circunstancia que no beneficia el mejor crecimiento microbiano.

⁷⁷ ACUÑA MOLINA, Nelson. REVISIÓN BIBLIOGRAFICA SOBRE LOS MICROORGANISMOS BIODEGRADADORES DE POLIETILENO DE BAJA DENSIDAD Y SUS EFECTOS EN EL MATERIAL [En línea]Universidad Distrital Francisco Jose de Caldas, 2017. 41 p.

⁷⁸ RUIZ, Gladys; MONTOYA, Carolina y PANIAGUA, Marco. DEGRADABILIDAD DE UN POLÍMERO DE ALMIDÓN DE YUCA. *Revista EIA*. 2009, nro. 12. pp. 67-78

⁷⁹ BOONMEE, Chomnutcha. KOSITANONT, Charnwit and LEEJARKPAI, Thanawadee. Degradation of Poly(lactic acid) under Simulated Landfill Conditions. *Environment and Natural Resources Journal*. 2016, vol. 14, nro. 2. pp. 1-9

⁸⁰ SHIMPI, Navinchandra G.; BORANE, Mahesh y MISHRA, Satyendra. Preparation, characterization, and biodegradation of PS:PLA and PS:PLA:OMMT nanocomposites using *Aspergillus niger*. *Polymer Composites*. 2014, vol. 35, nro. 2.

3.6 VALIDACIÓN DE RESULTADOS

Para considerar válida la prueba de determinación de biodegradabilidad aeróbica del ácido poliláctico en un medio acuoso de acuerdo con la norma guía ISO 14852: 2018 se debe tener en cuenta el cumplimiento de los siguientes parámetros:

- Tiempo de prueba no mayor a 6 meses.
- El porcentaje de biodegradación del control positivo es mayor al 60% al finalizar la prueba.
- Mínimo dos réplicas para el material de prueba (PLA).
- La medición del porcentaje de biodegradación es de acuerdo con la generación de dióxido de carbono.
- El control negativo no exceda el límite superior de porcentaje de biodegradación (60%)

Teniendo en cuenta los anteriores parámetros, se afirma que la evaluación de la biodegradación microbiana de un empaque plástico comercial de PLA por medio de un lodo activo, *Aspergillus* y lodo activo bioaumentado con *Aspergillus* en un medio acuoso aerobio llevado desarrollado en la Universidad Nacional de Colombia- Sede Bogotá es válida. Sin embargo, se observa en la Gráfica 1, Gráfica 2 y Gráfica 3 que el porcentaje de biodegradación de la celulosa no es mayor al 60%, esto debido al tiempo corto de prueba, la norma ISO 14852:2018 no especifica cual es el tiempo mínimo para realizar la prueba, no obstante, los resultados indican un notable porcentaje de biodegradación y pérdida de masa. Por otro lado, se afirma que el PLA tiene tendencia a la biodegradabilidad, esto se valida en los resultados de porcentaje de biodegradación, porcentaje de pérdida de masa, FTIR, SEM. El PLA tiene porcentajes de biodegradación y pérdida de masa mayores al control negativo y menores al control positivo en los tres diferentes inóculos, validándose un correcto proceso de biodegradación.

4.CONCLUSIONES

- Se evaluó la biodegradación microbiana del empaque plástico comercial de PLA en presencia de inóculos de lodo activo, *Aspergillus brasiliensis* y lodo activo bioaumentado un 10% con *A. brasiliensis* en un medio acuoso aerobio por medio de respirometría.
- Se logró establecer como parámetros adecuados para la biodegradación de un empaque plástico comercial de ácido poliláctico, bajo la norma ISO 14852:2004 : un flujo de aire uniforme de 0,11 L/min para cada biorreactor, rango de temperatura de 20 – 25 °C, concentración de 10^6 esporas/mL para *A. brasiliensis*, concentración de 1000 mg/L de lodo activo y pH de $7\pm 0,2$.
- De los tres tratamientos evaluados, la utilización de lodo activo describió un mayor porcentaje de biodegradabilidad (29%), seguido del uso de lodo activo bioaumentado con 10% de *A. brasiliensis* con un 20,4% y por último el solo uso de biomasa de *A. brasiliensis* con un 18,8%.
- Se comparó el desempeño de un lodo activo, lodo activo bioaumentado con un 10% de *A. brasiliensis* y solo uso de biomasa de *A. brasiliensis* en el proceso de biodegradación de PLA, siendo el lodo activo el mejor tratamiento.
- La degradación del polímero bajo los tres tratamientos fue caracterizada por microscopia electrónica de barrido (SEM), electroscopio de transmisión de infrarrojo por transformada de Fourier (FTIR) encontrando que en la prueba con el lodo activo se forma poros bien definidos e indicios de principios de fragmentación del material a una magnificación de 2500x y 0,53% de absorbancia en el grupo carbonilo siendo este el grupo que evidencia mayor degradación. Seguido del lodo activo bioaumentado con un 10% de *A. brasiliensis*, en cual se presentan múltiples poros con menor definición en la superficie del material a una magnificación de 1000x y 0,73% de absorbancia en el grupo carbonilo. Finalmente, con la biomasa de *A. brasiliensis* se observa un único daño provocado a la superficie a una magnificación de 2500x y 0,98% de absorbancia del grupo carbonilo.

5. RECOMENDACIONES

- Para un seguimiento completo del proceso de biodegradación del empaque plástico de PLA se puede considerar un aumento en el tiempo de prueba, no mayor a 6 meses para el cumplimiento de los parámetros de la norma ISO 14852:2018.
- Asegurar el flujo uniforme de aire en el alimento de todos los frascos fermentadores.
- Mantener la concentración de hidróxido de bario alta, alrededor de 0.072 N en las trampas de gases para darle longevidad al proceso de captación y evitar reemplazar las soluciones.
- Como parte del acondicionamiento del proceso, se sugiere ajustar el baño termostático a una temperatura de $23\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 3\text{ }^{\circ}\text{C}$ y adecuar a una concentración mayor a la relación de 10^6 esporas/mL con el objetivo de mejorar la actividad de las enzimas de *A. brasiliensis*.
- Realizar un proceso de esterilización al lodo activo para llevar a cabo la prueba de biodegradación con lodo sin bacterias para analizar el comportamiento individual de los hongos.

BIBLIOGRAFÍA

ACUÑA MOLINA, Nelson. Revisión bibliográfica sobre los microorganismos biodegradadores de polietileno de baja densidad y sus efectos en el material [En línea] Universidad Distrital Francisco Jose de Caldas, 2017. 41 p.

AKHTAR, Shazia, *et al.* Metal tolerance potential of filamentous fungi isolated from soils irrigated with untreated municipal effluent. *Soil & Environment*. 2013, vol. 32, nro. 1. pp. 55-62

Amerex. BIOAUMENTACIÓN: Una solución para aumentar la eficacia y la eficiencia en las plantas de tratamiento de efluentes [en línea]. <http://www.labamerex.com/novedad019.htm>. Consultado el 4 diciembre de 2019.

ARRIETA, Marina. Films de PLA y PLA-PHB plastificados para su aplicación en envases de alimentos. Caracterización y análisis de los procesos de degradación [en línea]Madrid: UNIVERSIDAD POLITÉCNICA DE VALENCIA, 2014. 354 p.

AURAS, R. HARTE, B. SELKE, S. An overview of polylactides as packaging materials. *Macromolecular Bioscience*. 2004;4(9):835-864. citado por ARRIETA, Marina. Films de PLA y PLA-PHB plastificados para su aplicación en envases de alimentos. Caracterización y análisis de los procesos de degradación.

AVEROUS, Luc. Biodegradable multiphase systems based on plasticized starch: A review. *Journal of Macromolecular Science-Polymer Reviews*. 2004;C44(3):231-274.

BERNAL BUSTOS, Claudio Raúl, *et al.* Hidrólisis enzimática de almidón. *Fundación Universidad de América Revista de Investigación*. 2017, vol. 10, nro. 1. pp. 129-140

BOONMEE, Chomnutcha. KOSITANONT, Charnwit and LEEJARKPAI, Thanawadee. Degradation of Poly(lactic acid) under Simulated Landfill Conditions. *Environment and Natural Resources Journal*. 2016, vol. 14, nro. 2. pp. 1-9.

CORREA, Liz. ZULUAGA, Fabio. VALENCIA, Carlos. GODOY, Jorge Eduardo. Elaboración de andamios porosos osteoinductivos de poli (ácido l-láctico) /quitosano para la regeneración de tejido óseo. *Revista Colombiana de Materiales*. 2015, vol. 6, pp. 34-53.

COUTINHO, Fernanda M. B. MELLO, Ivana L. SANTA MARIA, Luiz C. Polietileno: principais tipos, propriedades e aplicações. *Polímeros: Ciência e Tecnologia*. 2003, vol. 13, nro.1. pp. 1-13.

CUERVO, Raúl, *et al.* Determinación de la factibilidad del hongo "Metarhizium anisopliae" para ser usado como control biológico de la hormiga arriera (*Atta cephalotes*). *Guillermo de Ockham: Revista científica*. 2008, vol. 6, nro. 1. pp. 91-98

GOLDSTEIN, J., "Scanning electron microscopy and x-ray microanalysis", Kluwer Academic/Plenum Publishers, Vol. 140, No. 06 2003, pp 689.

GARCIA HERNANDEZ, Marisela. Aislamiento e identificación de hongos filamentosos tolerantes a metales pesados en el proceso de lodos activados en una planta de tratamiento de agua residual. Universidad Autónoma de Nuevo León, 2004. 3 p.

GROTHER, Enrico. MOO-YOUNG, Murray. y CHISTI, Yusuf. (1999). Fermentation optimization for the production of poly(beta-hydroxybutyric acid) microbial thermoplastic. *Enzyme and Microbial Technology*. 1999, Vol. 25.

HAHN, Sei Kwang. CHANG, Yong Keun. KIM, Beom Soo. CHANG Ho Nam (1994). Optimization of microbial poly(3-hydroxybutyrate) recovery using dispersions of sodium-hypochlorite solution and chloroform. *Biotechnol. Bioengineering*. 1994, Vol. 44.

HALIM HAMID S., B. AMIN M. MAADHAH A., Handbook of Polymer Degradation, Marcel Dekker, Inc., New York, 1992. Citado por. MIRANDA, José. Reacciones y sus mecanismos en la degradación de polímeros.

ISO. ISO 14851. Año 2019. Determination of the ultimate aerobic biodegradability of plastic materials in an aqueous medium — Method by measuring the oxygen demand in a closed respirometer.

ISO. ISO 14852. Año 2018. Determination of the ultimate aerobic biodegradability of plastic materials in an aqueous medium — Method by analysis of evolved carbon dioxide.

ISO. ISO 14855. Año 2018. Determination of the ultimate aerobic biodegradability of plastic materials under controlled composting conditions — Method by analysis of evolved carbon dioxide — Part 2: Gravimetric measurement of carbon dioxide evolved in a laboratory-scale test.

JONES, R. G. *et al.*, Eds. Glossary of Basic Terms in Polymer Science. En *Compendium of Polymer Terminology and Nomenclature: IUPAC Recommendations 2008*, The Royal Society of Chemistry, 1996, pp. 3-21

KOLLER, M. SALERNO, A. DIAS, M. REITERER, A. BRAUNEGG, G. Modern Biotechnological Polymer Synthesis: A Review. *Food Technology and Biotechnology*. 2010;48(3):255-269. citado por ARRIETA, Marina. Films de PLA y

PLA-PHB plastificados para su aplicación en envases de alimentos. Caracterización y análisis de los procesos de degradación.

KURTZ, SM. The UHMWPE Handbook: Ultra high molecular weight polyethylene in total joint replacement. San Diego California: Elsevier Academic Press; 2004

KWON-CHUNG, K.J. y BENNETT, Jhon. (1992). Medical Micology. Filadelfia-London: Lea & Febiger, pp. 223-234. Citado por. SÁEZ VEGA, Alex; FLORES VALDES, Liliana y CADAVID RENDON, Andrés. CARACTERIZACIÓN DE UNA CEPA NATIVA DE ASPERGILLUS NÍGER Y EVALUACIÓN DE LA PRODUCCIÓN DE ÁCIDO CÍTRICO.

MARCIA, E., *et al.* Estudio de la fermentación láctica para la extracción de quitina a partir de desechos de crustáceos. *Nexo Revista Científica*. 2011, vol. 24, nro. 1. pp. 33-42.

MEZA, Mauricio. Biodegradabilidad de polietileno tereftalato y de oxopolietileno, a nivel de laboratorio, por la acción de bacterias nativas presentes en humus de lombriz, caballo y gallina [en línea] Escuela politécnica del ejército, 2013.

MIRANDA, José. Reacciones y sus mecanismos en la degradación de polímeros [en línea] Instituto politécnico nacional escuela superior de ingeniería química e industrias extractivas, 2015. p 70.

MOELLER, Gabriela. TOMASINI, Ana Cecilia. Microbiología de lodos activados. Memorias curso internacional de sistemas integrados de tratamiento de aguas residuales y su reúso para un medio ambiente sustentable. Instituto Mexicano de Tecnología del Agua (IMTA). 2004. Disponible en: <http://documentacion.ideam.gov.co/openbiblio/bvirtual/018834/MEMORIAS2004/Capitulo1/5Microbiologiadelodosactivados.pdf>.

NORMA ASTM D 5247-92. Standard test method for determining the aerobic biodegradability of degradable plastics by specific microorganisms.

NÚÑEZ SALINAS, Manuel. Planta de producción de ácido poliláctico (PLA) a partir de ácido láctico [En línea] Universidad de Sevilla, 2019. 12 p.

NORMA ASTM D 6400-04. Standard specification for labeling of plastic designed to be aerobically composted in municipal or industrial facilities.

OROZCO OLIVARES, Fatima. Producción de ácido láctico por medio de fermentación anaerobia y su polimerización a partir de reacciones de apertura de anillo [En línea] Mérida: Centro de investigación científica de Yucatán, A. C., 2011. 31 p

PALECHOR, Jhon. Biodegradación aerobia bajo condiciones controladas de compostaje de una película flexible y una bandeja semirrígida obtenidas a partir de almidón y harina de yuca [En línea] Universidad Nacional de Colombia, 2017.

POSADA BUSTAMANTE, Beatriz. LA DEGRADACION DE LOS PLASTICOS. *Revista Universidad Eafit*. 1994. Vol. 30.

R. R. K. Pramila, «Biodegradation of low density polyethylene (LDPE) by fungi isolated from marine water-a SEM analysis,» *African Journal of Microbiology Res*, vol. 5, pp. 5013-5018, 2011a.

REYES OCAMPO, I.; LOPEZ ISUNZA, Felipe y GONZÁLEZ BRAMBILA, Margarita. Un análisis del metabolismo de *aspergillus niger* creciendo sobre un sustrato sólido. *Revista Mexicana de Ingeniería Química*. 2013, vol. 12, nro. Academia Mexicana de Investigación y Docencia en Ingeniería Química A.C

RINCÓN, Paula. Evaluación de la biodegradación del polipropileno, en un proceso de vermicompostaje, envejecido por termo- degradación [En línea] Fundación Universidad de América, 2015. 28 p.

RODRÍGUEZ CLAROS, Mónica. Efectos de la modificación de almidón de yuca y su mezcla con poli (Ácido láctico) (PLA) sobre su biodegradación [En línea] Universidad de los Andes, 2012. 52 p.

RODRÍGUEZ, Ángela. Desarrollo de una técnica alternativa de biodegradación en condiciones aerobias para el ácido poliláctico y mezcla PVA – almidón frente al polietileno en un medio sólido [En línea] Fundación Universidad de América, 2015. 104 p.

RODRÍGUEZ, Ariel. Biodegradabilidad de materiales bioplásticos. *Ciencia y Tecnología de los Alimentos*. 2012, vol. 22.

RUIZ, Gladys; MONTOYA, Carolina y PANIAGUA, Marco. Degradabilidad de un polímero de almidón de yuca. *Revista EIA*. 2009, nro. 12. pp. 67-78

RUIZ, M. I. y MOLINA, D. R. Determinación de los parámetros hidrolíticos para la producción de jarabes de glucosa a partir de almidón de yuca. p. 3

SANZ, Ascensión. Tecnología de la celulosa. La industria papelera [En línea]. [27 de noviembre de 2019]. Disponible en: <https://www.eii.uva.es/organica/qoi/tema-03.php>

SEGURA GONZALES, EDWIN ARIEL. Caracterización de materiales nanocompuestos basados en poli (Ácido poliláctico) y nanopartículas de sílice. [En línea], 12 de agosto de 2015 [revisado 16 de marzo de 2019].

SEGURA, D. NOGUEZ, R. ESPÍN, G. Contaminación ambiental y bacterias productoras de plásticos biodegradables. *Biotecnología*.14: 361-372, 2007

SERNA, Liliana; RODRÍGUEZ, Aida y ALBAN, Fred. Ácido poliláctico : Propiedades y Aplicaciones. *Ingeniería y Competividad*. 2003, vol. 5, nro. 1. pp. 16.

SHIMPI, Navinchandra G.; BORANE, Mahesh y MISHRA, Satyendra. Preparation, characterization, and biodegradation of PS:PLA and PS:PLA:OMMT nanocomposites using *Aspergillus niger*. *Polymer Composites*. 2014, vol. 35, nro. 2.

SÖDERGÅRD, A. y STOLT, M. Industrial Production of High Molecular Weight Poly(Lactic Acid) en *Poly (Lactic Acid)*, John Wiley & Sons, Ltd, 2010, pp. 27-41

TEJADA TOVAR, Ronald Eduardo. Obtención de ácido láctico por fermentación de almidón de ñame espinoso mediante el *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus* y el *Streptococcus thermophilus* para su uso en la producción de ácido poliláctico [En línea] Universidad de Cartagena - Universidad nacional de Colombia sede Medellín, 2015.

TÉLLEZ MALDONADO, Alejandra. La complejidad de la problemática ambiental de los residuos plásticos: una aproximación al análisis narrativo de política pública en Bogotá [En línea] Universidad Nacional de Colombia, 2012. 120 p

TOKIWA, J.; 2009."Biodegradability of Plastics". National Institute of Advanced Industrial Science and Technology. Higashi – Japón, 367-377. Citado por. MEZA, Mauricio. Biodegradabilidad de polietileno tereftalato y de oxopolietileno, a nivel de laboratorio, por la acción de bacterias nativas presentes en humus de lombriz, caballo y gallina.

VASQUEZ ALEMAN, Juan Pablo y VARGAS MARTINEZ, Gabriela. Aprovechamiento de lodos planta de tratamiento de aguas residuales municipio de Funza, como insumo de cultivo y mejoramiento del suelo. Universidad Católica de Colombia, 2018. 41 p.

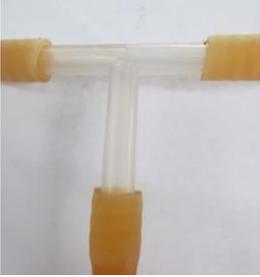
VÉLEZ, Patricia. POSADA, Francisco. MARIN, Patricia. GONZALEZ, María Teresa. OSORIO, Eduardo. BUSTILLO, Alex. Técnicas para el control de calidad de formulaciones de hongos entomopatógenos. Federación Nacional de Cafeteros de Colombia, Centro Nacional de Investigaciones de Café Pedro Uribe Mejía. CENICAFE, 1997. p. 9

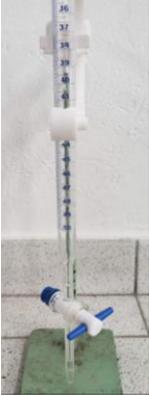
VINK, ETH. RÁBAGO, KR. GLASSNER, DA. GRUBER, PR. Applications of life cycle assessment to Nature Works™ polylactide (PLA) production. *Polymer Degradation and Stability*. 2003 403-419

ANEXOS

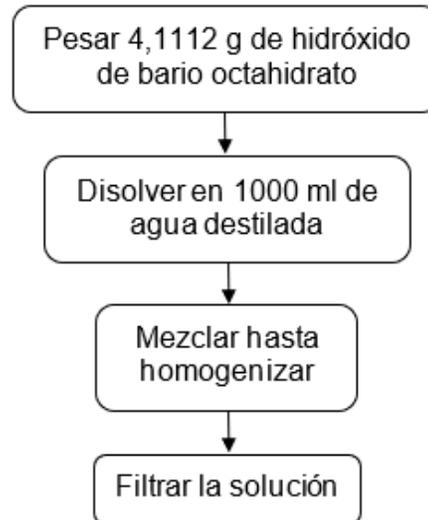
**ANEXO A.
ESPECIFICACIÓN DE EQUIPOS Y MATERIALES USADOS EN LA TÉCNICA**

EQUIPO O MATERIAL	IMAGEN	ESPECIFICACIONES
Manguera de látex	<p align="center">Figura 9. Manguera</p>  <p align="center">Fuente. Elaboración propia</p>	30 m de manguera de 5/16" no tóxicas, para el flujo de aire.
Válvula de bola	<p align="center">Figura 10. Válvula de bola</p>  <p align="center">Fuente. Elaboración propia</p>	Válvula de bola de 1/4" para el control de aire.
Recipiente de vidrio	<p align="center">Figura 11. Recipiente de vidrio</p>  <p align="center">Fuente. Elaboración propia</p>	18 recipientes de 250 mL con tapón adecuado para la entrada y salida de aire, estos como trampas de dióxido de carbono.

EQUIPO O MATERIAL	IMAGEN	ESPECIFICACIONES
<p>Recipiente de icopor</p>	<p>Figura 12. Recipiente de icopor</p>  <p>Fuente. Elaboración propia</p>	<p>Recipiente de icopor con dimensiones de 38x61x38 cm y capacidad de 48L, con tapa adecuada para la entrada y salida de aire mediante la manguera de látex.</p>
<p>Distribuidor de aire</p>	<p>Figura 13. Distribuidor de aire</p>  <p>Fuente. Elaboración propia</p>	<p>2 distribuidores de aire en vidrio de 320 mL, uno de ellos con 8 salidas y el otro con 10 salidas.</p>
<p>Divisor de aire</p>	<p>Figura 14. Divisor de aire</p>  <p>Fuente. Elaboración propia</p>	<p>Divisor de aire con una entrada y dos salidas para los distribuidores de aire.</p>

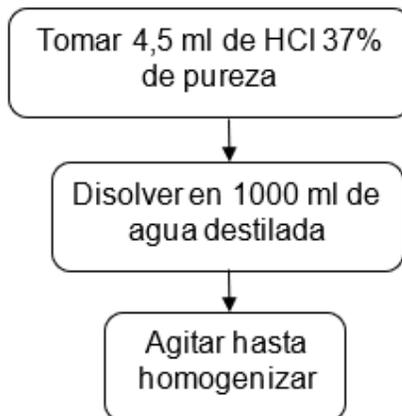
EQUIPO O MATERIAL	IMAGEN	ESPECIFICACIONES
Rotámetro de aire	<p data-bbox="695 302 1052 369">Figura 15. Rotámetro de aire</p>  <p data-bbox="808 705 938 730"><i>Ilustración 1</i></p> <p data-bbox="682 756 1065 793">Fuente. Elaboración propia</p>	<p data-bbox="1101 415 1458 592">Rotámetro con capacidad de 10 L/min, ubicado en la corriente de aire para el ajuste de aire.</p>
Bureta	<p data-bbox="750 831 997 869">Figura16. Bureta</p>  <p data-bbox="682 1268 1065 1306">Fuente. Elaboración propia</p>	<p data-bbox="1101 1016 1458 1121">Bureta de 25 mL para las titulaciones con ácido clorhídrico.</p>
Balón de vidrio	<p data-bbox="688 1335 1058 1373">Figura 17. Balón de vidrio</p>  <p data-bbox="682 1709 1065 1747">Fuente. Elaboración propia</p>	<p data-bbox="1101 1373 1458 1625">Balón de vidrio de 2 L con tapón adecuado para la entrada y salida de aire, este como trampa de dióxido de carbono para la corriente de aire.</p>

**ANEXO B.
PREPARACIÓN SOLUCIÓN HIDRÓXIDO DE BARIO**



Fuente: Elaboración propia

**ANEXO C.
PREPARACIÓN SOLUCIÓN ÁCIDO CLORHÍDRICO**



Fuente: Elaboración propia

ANEXO D. PROTOCOLO PARA RECUPERACIÓN CEPA LIOFILIZADA *A. BRASILIENSIS*



Banco de Cepas y Genes Instituto de Biotecnología

Recuperación de Cepas Liofilizadas.

La evaluación de este proceso debe ser realizada pre y pos liofilización.

1. En condiciones estériles se levanta la pestaña del agrafe y se sanitiza el vial con alcohol antiséptico ó Tego al 5%, para adicionar el agente hidratante del liofilizado.
2. El liofilizado debe ser hidratado con un volumen igual de suspensión que fue liofilizada, se utiliza agua destilada o agua peptonada esterilizada a 121°C por 15 min.
3. Una vez se ha hidratado, se deja en reposo 15 minutos y se agita en el vortex por 1 min. Se toman 100 a 200 microlitros (0.1-0.2 ml) los cuales son inoculados en el medio de cultivo específico para el crecimiento de la cepa liofilizada.
4. Se incuba a las condiciones establecidas para cada microorganismo. Los cultivos exhiben un prolongado periodo de adaptación y debe incubarse por periodos extendidos antes de considerar no viable el cultivo.
5. Se realiza un siembra por agotamiento en caja de petri, en el medio adecuado para el microorganismo.
6. Se realiza una lectura macroscópica y microscópica de las colonias, simultáneamente se evalúa la pureza. Los parámetros macroscópicos son: color, tamaño, forma, superficie, borde, consistencia y aspecto. Los microscópicos son: forma, afinidad por el Gram, agrupación y presencia ó ausencia de esporas.
7. Los demás viales deben ser almacenados a 4°C o en un lugar fresco y oscuro para que no se vean afectadas la viabilidad y estabilidad del microorganismo.

Ciudad universitaria Edificio 224
☎ 3165000 Ext. 16972
fax: 3165415 Ext. 16953
e-mail : dirib_bog@unal.edu.co
web: www.ibun.unal.edu.co
Bogotá, Colombia

ANEXO E.
TITULACIÓN DE LA SOLUCIÓN HIDRÓXIDO DE BARIO POR INÓCULOS

INÓCULO DE *A. BRASILIENSIS*

Titulación de la muestra de blanco

Días	mL de HCl	Moles de HCl	mmoles iniciales de Ba(OH) ₂	mmol CO ₂	Gramos CO ₂	Suma (Gramos CO ₂)
2	4,9	0,245	8,64	8,5175	0,3748	0,3748
6	4,7	0,235	8,64	8,5225	0,375	0,7498
7	4,4	0,22	8,64	8,53	0,3753	1,1251
8	4,7	0,235	8,64	8,5225	0,375	1,5001
9	4,5	0,225	8,64	8,5275	0,3752	1,8753
13	4,4	0,22	5,328	5,218	0,2296	2,1049
15	4	0,2	5,328	5,228	0,23	2,3349
16	4,4	0,22	5,328	5,218	0,2296	2,5645
19	4,3	0,215	5,328	5,2205	0,2297	2,7942
20	4,1	0,205	5,328	5,2255	0,2299	3,0241
21	4	0,2	7,992	7,892	0,3473	3,3714
22	4,07	0,2035	7,992	7,8903	0,3472	3,7185
23	3,95	0,1975	7,992	7,8933	0,3473	4,0658
26	3,8	0,19	7,992	7,897	0,3475	4,4133
27	3,7	0,185	7,992	7,8995	0,3476	4,7609

Titulación de la muestra de celulosa

Días	mL de HCl	Moles de HCl	mmoles iniciales de Ba(OH) ₂	mmol CO ₂	Gramos CO ₂	Suma (Gramos CO ₂)
2	4,85	0,2425	8,64	8,51875	0,37483	0,3748
6	4,46	0,223	8,64	8,5285	0,37525	0,7501
7	4,26	0,213	8,64	8,5335	0,37547	1,1256
8	4,4	0,22	8,64	8,53	0,37532	1,5009
9	4,3	0,215	8,64	8,5325	0,37543	1,8763
13	4,1	0,205	5,328	5,2255	0,22992	2,1062
15	3,8	0,19	5,328	5,233	0,23025	2,3365
16	3,83	0,1915	5,328	5,23225	0,23022	2,5667
19	4	0,2	5,328	5,228	0,23003	2,7967
20	3,7	0,185	5,328	5,2355	0,23036	3,0271
21	3,6	0,18	7,992	7,902	0,34769	3,3748

Días	mL de HCl	Moles de HCl	mmoles iniciales de Ba(OH) ₂	mmol CO ₂	Gramos CO ₂	Suma (Gramos CO ₂)
22	3,6	0,18	7,992	7,902	0,34769	3,7225
23	3,53	0,1765	7,992	7,90375	0,34777	4,0702
26	3,5	0,175	7,992	7,9045	0,3478	4,418
27	3,2	0,16	7,992	7,912	0,34813	4,7662

Titulación de la muestra de HDPE

Días	mL de HCl	Moles de HCl	mmoles iniciales de Ba(OH) ₂	mmol CO ₂	Gramos CO ₂	Suma (Gramos CO ₂)
2	4,5	0,225	8,64	8,5275	0,37521	0,3752
6	4,5	0,225	8,64	8,5275	0,37521	0,7504
7	4,5	0,225	8,64	8,5275	0,37521	1,1256
8	4,6	0,23	8,64	8,525	0,3751	1,5007
9	4,4	0,22	8,64	8,53	0,37532	1,8761
13	4,4	0,22	5,328	5,218	0,22959	2,1056
15	4,1	0,205	5,328	5,2255	0,22992	2,3356
16	4,2	0,21	5,328	5,223	0,22981	2,5654
19	4,18	0,209	5,328	5,2235	0,22983	2,7952
20	4,1	0,205	5,328	5,2255	0,22992	3,0251
21	3,9	0,195	7,992	7,8945	0,34736	3,3725
22	3,9	0,195	7,992	7,8945	0,34736	3,7198
23	3,8	0,19	7,992	7,897	0,34747	4,0673
26	3,85	0,1925	7,992	7,89575	0,34741	4,4147
27	3,55	0,1775	7,992	7,90325	0,34774	4,7625

Titulación de la muestra PLA

Días	mL de HCl	Moles de HCl	mmoles iniciales de Ba(OH) ₂	mmol CO ₂	Gramos CO ₂	Suma (Gramos CO ₂)
2	4,7	0,235	8,64	8,5225	0,3750	0,3750
6	4,4	0,22	8,64	8,5300	0,3753	0,7503
7	4,1	0,205	8,64	8,5375	0,3757	1,1260
8	4,6	0,23	8,64	8,5250	0,3751	1,5011
9	4,2	0,21	8,64	8,5350	0,3755	1,8766
13	4,1	0,205	5,328	5,2255	0,2299	2,1065
15	3,9	0,195	5,328	5,2305	0,2301	2,3367
16	4,2	0,21	5,328	5,2230	0,2298	2,5665

Días	mL de HCl	Moles de HCl	mmoles iniciales de Ba(OH) ₂	mmol CO ₂	Gramos CO ₂	Suma (Gramos CO ₂)
19	3,6	0,18	5,328	5,2380	0,2305	2,7969
20	3,7	0,185	5,328	5,2355	0,2304	3,0273
21	3,6	0,18	7,992	7,9020	0,3477	3,3750
22	3,8	0,19	7,992	7,8970	0,3475	3,7225
23	3,6	0,18	7,992	7,9020	0,3477	4,0702
26	3,6	0,18	7,992	7,9020	0,3477	4,4178
27	3,5	0,175	7,992	7,9045	0,3478	4,7656

Titulación de la muestra PLA (réplica 1)

Días	mL de HCl	Moles de HCl	mmoles iniciales de Ba(OH) ₂	mmol CO ₂	Gramos CO ₂	Suma (Gramos CO ₂)
2	5,05	0,2525	8,64	8,51375	0,374605	0,374605
6	4,05	0,2025	8,64	8,53875	0,375705	0,75031
7	4,5	0,225	8,64	8,5275	0,37521	1,12552
8	4,6	0,23	8,64	8,525	0,3751	1,50062
9	4,3	0,215	8,64	8,5325	0,37543	1,87605
13	4,1	0,205	5,328	5,2255	0,229922	2,105972
15	4,1	0,205	5,328	5,2255	0,229922	2,335894
16	4,2	0,21	5,328	5,223	0,229812	2,565706
19	3,6	0,18	5,328	5,238	0,230472	2,796178
20	3,7	0,185	5,328	5,2355	0,230362	3,02654
21	3,6	0,18	7,992	7,902	0,347688	3,374228
22	3,8	0,19	7,992	7,897	0,347468	3,721696
23	3,6	0,18	7,992	7,902	0,347688	4,069384
26	3,7	0,185	7,992	7,8995	0,347578	4,416962
27	3,4	0,17	7,992	7,907	0,347908	4,76487

Titulación de la muestra PLA (réplica 2)

Días	mL de HCl	Moles de HCl	mmoles iniciales de Ba(OH) ₂	mmol CO ₂	Gramos CO ₂	Suma (Gramos CO ₂)
2	3,1	0,155	8,64	8,5625	0,37675	0,37675
6	1,9	0,095	8,64	8,5925	0,37807	0,75482
7	3	0,15	8,64	8,565	0,37686	1,13168
8	3,5	0,175	8,64	8,5525	0,37631	1,50799
9	3,5	0,175	8,64	8,5525	0,37631	1,8843

Días	mL de HCl	Moles de HCl	mmoles iniciales de Ba(OH) ₂	mmol CO ₂	Gramos CO ₂	Suma (Gramos CO ₂)
13	4,6	0,23	5,328	5,213	0,229372	2,113672
15	4,1	0,205	5,328	5,2255	0,229922	2,343594
16	4,25	0,2125	5,328	5,22175	0,229757	2,573351
19	3,2	0,16	5,328	5,248	0,230912	2,804263
20	3,85	0,1925	5,328	5,23175	0,230197	3,03446
21	3,6	0,18	7,992	7,902	0,347688	3,382148
22	4,1	0,205	7,992	7,8895	0,347138	3,729286
23	3,83	0,1915	7,992	7,89625	0,347435	4,076721
26	3,7	0,185	7,992	7,8995	0,347578	4,424299
27	3,4	0,17	7,992	7,907	0,347908	4,772207

INÓCULO DE LODO ACTIVO

Titulación de la muestra de blanco

Días	mL de HCl	Moles de HCl	mmoles iniciales de Ba(OH) ₂	mmol CO ₂	Gramos CO ₂	Suma (Gramos CO ₂)
2	4,6	0,23	8,64	8,5250	0,3751	0,3751
6	4,4	0,22	8,64	8,5300	0,3753	0,7504
7	4,4	0,22	8,64	8,5300	0,3753	1,1257
8	4,5	0,225	8,64	8,5275	0,3752	1,5010
9	4,4	0,22	8,64	8,5300	0,3753	1,8763
13	4,55	0,2275	5,328	5,2143	0,2294	2,1057
15	4,1	0,205	5,328	5,2255	0,2299	2,3356
16	4,2	0,21	5,328	5,2230	0,2298	2,5654
19	4	0,2	5,328	5,2280	0,2300	2,7955
20	4	0,2	5,328	5,2280	0,2300	3,0255
21	3,9	0,195	7,992	7,8945	0,3474	3,3729
22	3,94	0,197	7,992	7,8935	0,3473	3,7202
23	3,9	0,195	7,992	7,8945	0,3474	4,0675
26	3,8	0,19	7,992	7,8970	0,3475	4,4150
27	3,7	0,185	7,992	7,8995	0,3476	4,7626

Titulación de la muestra de celulosa

Días	mL de HCl	Moles de HCl	mmoles iniciales de Ba(OH) ₂	mmol CO ₂	Gramos CO ₂	Suma (Gramos CO ₂)
2	4,6	0,23	8,64	8,5250	0,3751	0,3751
6	2	0,1	8,64	8,5900	0,3780	0,7531
7	2,3	0,115	8,64	8,5825	0,3776	1,1307
8	4,2	0,21	8,64	8,5350	0,3755	1,5062
9	4,3	0,215	8,64	8,5325	0,3754	1,8817
13	3,9	0,195	5,328	5,2305	0,2301	2,1118
15	3,8	0,19	5,328	5,2330	0,2303	2,3421
16	3,9	0,195	5,328	5,2305	0,2301	2,5722
19	3,61	0,1805	5,328	5,2378	0,2305	2,8027
20	3,65	0,1825	5,328	5,2368	0,2304	3,0331
21	3,6	0,18	7,992	7,9020	0,3477	3,3808
22	3,72	0,186	7,992	7,8990	0,3476	3,7283
23	3,5	0,175	7,992	7,9045	0,3478	4,0761
26	3,4	0,17	7,992	7,9070	0,3479	4,4240
27	3	0,15	7,992	7,9170	0,3483	4,7724

Titulación de la muestra de HDPE

Días	mL de HCl	Moles de HCl	mmoles iniciales de Ba(OH) ₂	mmol CO ₂	Gramos CO ₂	Suma (Gramos CO ₂)
2	4,5	0,225	8,64	8,5275	0,3752	0,3752
6	4,3	0,215	8,64	8,5325	0,3754	0,7506
7	4,1	0,205	8,64	8,5375	0,3757	1,1263
8	4	0,2	8,64	8,5400	0,3758	1,5021
9	4,4	0,22	8,64	8,5300	0,3753	1,8774
13	4,4	0,22	5,328	5,2180	0,2296	2,1070
15	4,1	0,205	5,328	5,2255	0,2299	2,3369
16	4,2	0,21	5,328	5,2230	0,2298	2,5667
19	3,7	0,185	5,328	5,2355	0,2304	2,7971
20	3,7	0,185	5,328	5,2355	0,2304	3,0274
21	3,5	0,175	7,992	7,9045	0,3478	3,3752
22	3,7	0,185	7,992	7,8995	0,3476	3,7228
23	3,61	0,1805	7,992	7,9018	0,3477	4,0705
26	3,4	0,17	7,992	7,9070	0,3479	4,4184
27	3,4	0,17	7,992	7,9070	0,3479	4,7663

Titulación de la muestra PLA

Días	mL de HCl	Moles de HCl	mmoles iniciales de Ba(OH) ₂	mmol CO ₂	Gramos CO ₂	Suma (Gramos CO ₂)
2	4,65	0,2325	8,64	8,52375	0,375045	0,375045
6	4,4	0,22	8,64	8,53	0,37532	0,750365
7	4,3	0,215	8,64	8,5325	0,37543	1,125795
8	4	0,2	8,64	8,54	0,37576	1,501555
9	4	0,2	8,64	8,54	0,37576	1,877315
13	3,92	0,196	5,328	5,23	0,23012	2,107435
15	2,7	0,135	5,328	5,2605	0,231462	2,338897
16	3,73	0,1865	5,328	5,23475	0,230329	2,569226
19	3,011	0,15055	5,328	5,252725	0,2311199	2,8003459
20	3,11	0,1555	5,328	5,25025	0,231011	3,0313569
21	2,6	0,13	7,992	7,927	0,348788	3,3801449
22	2,7	0,135	7,992	7,9245	0,348678	3,7288229
23	2,64	0,132	7,992	7,926	0,348744	4,0775669
26	2,5	0,125	7,992	7,9295	0,348898	4,4264649
27	2,2	0,11	7,992	7,937	0,349228	4,7756929

Titulación de la muestra PLA (réplica 1)

Días	mL de HCl	Moles de HCl	mmoles iniciales de Ba(OH) ₂	mmol CO ₂	Gramos CO ₂	Suma (Gramos CO ₂)
2	4,45	0,2225	8,64	8,52875	0,375265	0,375265
6	4,2	0,21	8,64	8,535	0,37554	0,750805
7	4,2	0,21	8,64	8,535	0,37554	1,126345
8	4,1	0,205	8,64	8,5375	0,37565	1,501995
9	4	0,2	8,64	8,54	0,37576	1,877755
13	3,97	0,1985	5,328	5,22875	0,230065	2,10782
15	3,78	0,189	5,328	5,2335	0,230274	2,338094
16	3,1	0,155	5,328	5,2505	0,231022	2,569116
19	3,26	0,163	5,328	5,2465	0,230846	2,799962
20	3,18	0,159	5,328	5,2485	0,230934	3,030896
21	3,4	0,17	7,992	7,907	0,347908	3,378804
22	3,5	0,175	7,992	7,9045	0,347798	3,726602
23	3,5	0,175	7,992	7,9045	0,347798	4,0744
26	3,4	0,17	7,992	7,907	0,347908	4,422308
27	3,1	0,155	7,992	7,9145	0,348238	4,770546

Titulación de la muestra PLA (réplica 2)

Días	mL de HCl	Moles de HCl	mmoles iniciales de Ba(OH) ₂	mmol CO ₂	Gramos CO ₂	Suma (Gramos CO ₂)
2	3,5	0,175	8,64	8,5525	0,37631	0,37631
6	3,3	0,165	8,64	8,5575	0,37653	0,75284
7	3,2	0,16	8,64	8,56	0,37664	1,12948
8	3,1	0,155	8,64	8,5625	0,37675	1,50623
9	3,2	0,16	8,64	8,56	0,37664	1,88287
13	4,45	0,2225	5,328	5,21675	0,229537	2,112407
16	3,9	0,195	5,328	5,2305	0,230142	2,572691
19	3,6	0,18	5,328	5,238	0,230472	2,803163
20	3,4	0,17	5,328	5,243	0,230692	3,033855
21	3,4	0,17	7,992	7,907	0,347908	3,381763
22	3,5	0,175	7,992	7,9045	0,347798	3,729561
23	3,5	0,175	7,992	7,9045	0,347798	4,077359
26	3,4	0,17	7,992	7,907	0,347908	4,425267
27	3,1	0,155	7,992	7,9145	0,348238	4,773505

INÓCULO DE LODO ACTIVO BIOAUMENTADO UN 10% CON *A. BRASILIENSIS*.

Titulación de la muestra de blanco

Días	mL de HCl	Moles de HCl	mmoles iniciales de Ba(OH) ₂	mmol CO ₂	Gramos CO ₂	Suma (Gramos CO ₂)
2	4,7	0,235	8,64	8,5225	0,3750	0,3750
6	4,5	0,225	8,64	8,5275	0,3752	0,7502
7	4,4	0,22	8,64	8,5300	0,3753	1,1255
8	4,4	0,22	8,64	8,5300	0,3753	1,5008
9	4,5	0,225	8,64	8,5275	0,3752	1,8761
13	4,4	0,22	5,328	5,2180	0,2296	2,1056
15	4,4	0,22	5,328	5,2180	0,2296	2,3352
16	4,25	0,2125	5,328	5,2218	0,2298	2,5650
19	4,3	0,215	5,328	5,2205	0,2297	2,7947
20	3,85	0,1925	5,328	5,2318	0,2302	3,0249
21	3,8	0,19	7,992	7,8970	0,3475	3,3724
22	3,97	0,1985	7,992	7,8928	0,3473	3,7196
23	3,88	0,194	7,992	7,8950	0,3474	4,0670
26	3,7	0,185	7,992	7,8995	0,3476	4,4146
27	3,65	0,1825	7,992	7,9008	0,3476	4,7622

Titulación de la muestra de celulosa

Días	mL de HCl	Moles de HCl	mmoles iniciales de Ba(OH) ₂	mmol CO ₂	Gramos CO ₂	Suma (Gramos CO ₂)
2	4,5	0,225	8,64	8,5275	0,3752	0,3752
6	4,2	0,21	8,64	8,5350	0,3755	0,7508
7	4,2	0,21	8,64	8,5350	0,3755	1,1263
8	4,1	0,205	8,64	8,5375	0,3757	1,5019
9	3,9	0,195	8,64	8,5425	0,3759	1,8778
13	3,3	0,165	5,328	5,2455	0,2308	2,1086
15	3,8	0,19	5,328	5,2330	0,2303	2,3389
16	3,8	0,19	5,328	5,2330	0,2303	2,5691
19	2,8	0,14	5,328	5,2580	0,2314	2,8005
20	2,9	0,145	5,328	5,2555	0,2312	3,0317
21	3,1	0,155	7,992	7,9145	0,3482	3,3799
22	2,89	0,1445	7,992	7,9198	0,3485	3,7284
23	3,12	0,156	7,992	7,9140	0,3482	4,0766
26	3,3	0,165	7,992	7,9095	0,3480	4,4247
27	3,3	0,165	7,992	7,9095	0,3480	4,7727

Titulación de la muestra de HDPE

Días	mL de HCl	Moles de HCl	mmoles iniciales de Ba(OH) ₂	mmol CO ₂	Gramos CO ₂	Suma (Gramos CO ₂)
2	4,4	0,22	8,64	8,5300	0,3753	0,3753
6	4,4	0,22	8,64	8,5300	0,3753	0,7506
7	4,3	0,215	8,64	8,5325	0,3754	1,1261
8	4,25	0,2125	8,64	8,5338	0,3755	1,5016
9	4,35	0,2175	8,64	8,5313	0,3754	1,8769
13	3,9	0,195	5,328	5,2305	0,2301	2,1071
15	3	0,15	5,328	5,2530	0,2311	2,3382
16	4	0,2	5,328	5,2280	0,2300	2,5682
19	4,5	0,225	5,328	5,2155	0,2295	2,7977
20	3,9	0,195	5,328	5,2305	0,2301	3,0279
21	3,8	0,19	7,992	7,8970	0,3475	3,3753
22	3,77	0,1885	7,992	7,8978	0,3475	3,7228
23	3,73	0,1865	7,992	7,8988	0,3475	4,0704
26	3,75	0,1875	7,992	7,8983	0,3475	4,4179
27	3,5	0,175	7,992	7,9045	0,3478	4,7657

Titulación de la muestra PLA

Días	mL de HCl	Moles de HCl	mmoles iniciales de Ba(OH) ₂	mmol CO ₂	Gramos CO ₂	Suma (Gramos CO ₂)
2	4,6	0,23	8,64	8,525	0,3751	0,3751
6	4,5	0,225	8,64	8,5275	0,37521	0,75031
7	4,4	0,22	8,64	8,53	0,37532	1,12563
8	4,4	0,22	8,64	8,53	0,37532	1,50095
9	4,3	0,215	8,64	8,5325	0,37543	1,87638
13	4,2	0,21	5,328	5,223	0,229812	2,106192
15	4,1	0,205	5,328	5,2255	0,229922	2,336114
16	4	0,2	5,328	5,228	0,230032	2,566146
19	4	0,2	5,328	5,228	0,230032	2,796178
20	3,6	0,18	5,328	5,238	0,230472	3,02665
21	3,5	0,175	7,992	7,9045	0,347798	3,374448
22	3,51	0,1755	7,992	7,90425	0,347787	3,722235
23	3,61	0,1805	7,992	7,90175	0,347677	4,069912
26	3,65	0,1825	7,992	7,90075	0,347633	4,417545
27	3,4	0,17	7,992	7,907	0,347908	4,765453

Titulación de la muestra PLA (réplica 1)

Días	mL de HCl	Moles de HCl	mmoles iniciales de Ba(OH) ₂	mmol CO ₂	Gramos CO ₂	Suma (Gramos CO ₂)
2	4	0,2	8,64	8,54	0,37576	0,37576
6	4,5	0,225	8,64	8,5275	0,37521	0,75097
7	4,3	0,215	8,64	8,5325	0,37543	1,1264
8	4,3	0,215	8,64	8,5325	0,37543	1,50183
9	4,4	0,22	8,64	8,53	0,37532	1,87715
13	4,2	0,21	5,328	5,223	0,229812	2,106962
15	4,3	0,215	5,328	5,2205	0,229702	2,336664
16	4	0,2	5,328	5,228	0,230032	2,566696
19	3,5	0,175	5,328	5,2405	0,230582	2,797278
20	3,6	0,18	5,328	5,238	0,230472	3,02775
21	3,5	0,175	7,992	7,9045	0,347798	3,375548
22	3,24	0,162	7,992	7,911	0,348084	3,723632
23	3,5	0,175	7,992	7,9045	0,347798	4,07143
26	3,6	0,18	7,992	7,902	0,347688	4,419118
27	3,3	0,165	7,992	7,9095	0,348018	4,767136

Titulación de la muestra PLA (réplica 2)

Días	mL de HCl	Moles de HCl	mmoles iniciales de Ba(OH) ₂	mmol CO ₂	Gramos CO ₂	Suma (Gramos CO ₂)
2	2,8	0,14	8,64	8,57	0,37708	0,37708
6	2,4	0,12	8,64	8,58	0,37752	0,7546
7	2,4	0,12	8,64	8,58	0,37752	1,13212
8	2,4	0,12	8,64	8,58	0,37752	1,50964
9	3	0,15	8,64	8,565	0,37686	1,8865
13	4,2	0,21	5,328	5,223	0,229812	2,116312
15	4	0,2	5,328	5,228	0,230032	2,346344
16	3,8	0,19	5,328	5,233	0,230252	2,576596
19	3,7	0,185	5,328	5,2355	0,230362	2,806958
20	3,5	0,175	5,328	5,2405	0,230582	3,03754
21	3,4	0,17	7,992	7,907	0,347908	3,385448
22	3,67	0,1835	7,992	7,90025	0,347611	3,733059
23	3,63	0,1815	7,992	7,90125	0,347655	4,080714
26	3,4	0,17	7,992	7,907	0,347908	4,428622
27	3,3	0,165	7,992	7,9095	0,348018	4,77664

ANEXO F.
PORCENTAJES DE BIODEGRADACIÓN DEL PLA CON ANÁLISIS ESTADÍSTICO

INÓCULO	DÍAS	MUESTRA PLA	RÉPLICA #1 PLA (%)	RÉPLICA #2 PLA (%)	PROMEDIO (%)	DESVIACIÓN ESTÁNDAR	INTERVALO DE CONFIANZA (±)
<i>A. brasiliensis</i>	2	2,4829	-0,4484	5,3678	2,4674	2,9081	0,1189
	6	3,3804	1,4948	13,7177	6,1976	6,5805	0,2690
	7	4,2778	1,1958	17,8926	7,7888	8,8849	0,3632
	8	6,6710	1,4948	21,4712	9,8790	10,3674	0,4238
	9	8,1667	2,0927	24,4533	11,5709	11,5625	0,4726
	13	8,1667	2,9895	23,8569	11,6710	10,8661	0,4442
	15	8,1667	2,6906	23,5586	11,4720	10,8195	0,4423
	16	8,7650	3,2885	24,0060	12,0198	10,7354	0,4388
	19	10,5599	5,3812	27,2863	14,4091	11,4486	0,4680
	20	11,6069	6,5770	28,0318	15,4052	11,2204	0,4586
	21	12,6539	7,7728	29,2247	16,5505	11,2442	0,4596
	22	13,4616	8,5800	29,1352	17,0589	10,7394	0,4390
	23	14,5087	9,6263	29,4930	17,8760	10,3526	0,4232
	26	15,1069	9,9253	29,7913	18,2745	10,3048	0,4212
	27	15,1069	10,8221	30,6859	18,8717	10,4533	0,4273
Lodo activo	2	-0,1496	0,4478	3,2901	1,1961	1,8379	0,0751
	6	-0,1496	1,0448	6,5803	2,4918	3,5907	0,1468
	7	0,1496	1,6418	10,1695	3,9870	5,4059	0,2210
	8	1,6460	2,8358	14,3569	6,2796	7,0204	0,2870
	9	2,8432	4,0299	17,9462	8,2731	8,3981	0,3433
	13	4,7287	5,7612	18,2453	9,5784	7,5235	0,3075
	15	8,9186	6,7164	18,8435	11,4928	6,4604	0,2641
	16	10,3252	10,0000	19,7408	13,3553	5,5323	0,2261

INÓCULO	DÍAS	MUESTRA PLA	RÉPLICA #1 PLA (%)	RÉPLICA #2 PLA (%)	PROMEDIO (%)	DESVIACIÓN ESTÁNDAR	INTERVALO DE CONFIANZA (±)
	19	13,2851	12,2090	20,9372	15,4771	4,7591	0,1945
	20	15,9487	14,6567	22,7318	17,7791	4,3376	0,1773
	21	19,8394	16,1493	24,2273	20,0720	4,0441	0,1653
	22	23,5505	17,4627	25,5434	22,1855	4,2097	0,1721
	23	27,3214	18,6567	26,7398	24,2393	4,8434	0,1980
	26	31,2121	19,8507	27,9362	26,3330	5,8479	0,2390
	27	35,7013	21,6418	29,7308	29,0246	7,0563	0,2884
Lodo activo bioaumentado un 10% con <i>A. brasilensis</i>	2	0,2990	2,0854	5,6861	2,6902	2,7440	0,1122
	6	0,2990	2,0854	11,9707	4,7850	6,2867	0,2570
	7	0,2990	2,3833	17,9560	6,8794	9,6490	0,3944
	8	0,2990	2,6812	23,9413	8,9739	13,0168	0,5321
	9	0,8970	2,9791	28,4303	10,7688	15,3307	0,6267
	13	1,4949	3,5750	29,0289	11,3663	15,3316	0,6267
	15	2,3919	3,8729	30,2259	12,1636	15,6600	0,6401
	16	3,1393	4,6177	31,5726	13,1099	16,0063	0,6543
	19	4,0363	7,0010	33,3682	14,8018	16,1472	0,6600
	20	4,7837	7,7458	34,4157	15,6484	16,3203	0,6671
	21	5,6807	8,6395	35,6127	16,6443	16,4936	0,6742
	22	7,0560	10,8143	36,5105	18,1270	16,0312	0,6553
	23	7,8633	11,9464	37,2587	19,0228	15,9242	0,6509
	26	8,0128	12,2443	38,1565	19,4712	16,3197	0,6671
27	8,7602	13,2870	39,2040	20,4171	16,4266	0,6715	

**ANEXO G.
DIÓXIDO DE CARBONO GENERADO CON ANÁLISIS ESTADÍSTICO**

INÓCULO	DÍAS	MUESTRA PLA (g)	RÉPLICA #1 PLA (g)	RÉPLICA #2 PLA (g)	PROMEDIO (g)	DESVIACIÓN ESTÁNDAR	INTERVALO DE CONFIANZA (±)
<i>A. brasiliensis</i>	2	0,3757	0,3746	0,3768	0,3757	1,0725E-03	4,3840E-05
	6	0,7510	0,7503	0,7548	0,7520	2,4286E-03	9,9273E-05
	7	1,1267	1,1255	1,1317	1,1280	3,2787E-03	1,3402E-04
	8	1,5025	1,5006	1,5080	1,5037	3,8259E-03	1,5639E-04
	9	1,8783	1,8761	1,8843	1,8795	4,2672E-03	1,7443E-04
	13	2,1079	2,1060	2,1137	2,1092	4,0107E-03	1,6394E-04
	15	2,3379	2,3359	2,3436	2,3391	3,9934E-03	1,6323E-04
	16	2,5677	2,5657	2,5734	2,5689	3,9627E-03	1,6198E-04
	19	2,7981	2,7962	2,8043	2,7995	4,2270E-03	1,7278E-04
	20	3,0284	3,0265	3,0345	3,0298	4,1435E-03	1,6937E-04
	21	3,3760	3,3742	3,3821	3,3775	4,1529E-03	1,6976E-04
	22	3,7235	3,7217	3,7293	3,7248	3,9671E-03	1,6216E-04
	23	4,0712	4,0694	4,0767	4,0724	3,8250E-03	1,5635E-04
	26	4,4189	4,4170	4,4243	4,4200	3,8075E-03	1,5563E-04
27	4,7664	4,7649	4,7722	4,7678	3,8628E-03	1,5790E-04	
Lodo activo	2	0,3750	0,3753	0,3763	0,3755	6,7585E-04	2,7626E-05
	6	0,7504	0,7508	0,7528	0,7513	1,3204E-03	5,3972E-05
	7	1,1258	1,1263	1,1295	1,1272	1,9879E-03	8,1256E-05
	8	1,5016	1,5020	1,5062	1,5033	2,5815E-03	1,0552E-04
	9	1,8773	1,8778	1,8829	1,8793	3,0880E-03	1,2623E-04
	13	2,1074	2,1078	2,1124	2,1092	2,7662E-03	1,1307E-04
	15	2,3389	2,3381	2,3425	2,3398	2,3745E-03	9,7059E-05
	16	2,5692	2,5691	2,5727	2,5703	2,0330E-03	8,3102E-05
	19	2,8003	2,8000	2,8032	2,8012	1,7478E-03	7,1445E-05

INÓCULO	DÍAS	MUESTRA PLA (g)	RÉPLICA #1 PLA (g)	RÉPLICA #2 PLA (g)	PROMEDIO (g)	DESVIACIÓN ESTÁNDAR	INTERVALO DE CONFIANZA (±)
	20	3,0314	3,0309	3,0339	3,0320	1,5921E-03	6,5078E-05
	21	3,3801	3,3788	3,3818	3,3802	1,4817E-03	6,0564E-05
	22	3,7288	3,7266	3,7296	3,7283	1,5402E-03	6,2956E-05
	23	4,0776	4,0744	4,0774	4,0764	1,7714E-03	7,2410E-05
	26	4,4265	4,4223	4,4253	4,4247	2,1397E-03	8,7463E-05
	27	4,7757	4,7705	4,7735	4,7732	2,5831E-03	1,0559E-04
Lodo activo bioaumentado un 10% con <i>A.</i> <i>brasiliensis</i>	2	0,3751	0,3758	0,3771	0,3760	1,0082E-03	4,1210E-05
	6	0,7503	0,7510	0,7546	0,7520	2,3100E-03	9,4423E-05
	7	1,1256	1,1264	1,1321	1,1281	3,5457E-03	1,4493E-04
	8	1,5010	1,5018	1,5096	1,5041	4,7834E-03	1,9553E-04
	9	1,8764	1,8772	1,8865	1,8800	5,6337E-03	2,3028E-04
	13	2,1062	2,1070	2,1163	2,1098	5,6337E-03	2,3028E-04
	15	2,3361	2,3367	2,3463	2,3397	5,7541E-03	2,3520E-04
	16	2,5661	2,5667	2,5766	2,5698	5,8810E-03	2,4039E-04
	19	2,7962	2,7973	2,8070	2,8001	5,9318E-03	2,4247E-04
	20	3,0267	3,0278	3,0375	3,0306	5,9951E-03	2,4505E-04
	21	3,3744	3,3755	3,3854	3,3785	6,0583E-03	2,4764E-04
	22	3,7222	3,7236	3,7331	3,7263	5,8875E-03	2,4066E-04
	23	4,0699	4,0714	4,0807	4,0740	5,8478E-03	2,3903E-04
	26	4,4175	4,4191	4,4286	4,4218	5,9931E-03	2,4497E-04
27	4,7655	4,7671	4,7766	4,7697	6,0320E-03	2,4656E-04	

**ANEXO H.
PORCENTAJES DE BIODEGRADACIÓN**

PORCENTAJE DE BIODEGRADACIÓN									
INÓCULO	<i>A. brasiliensis</i>			Lodo activo			Lodo activo bioaumentado un 10% con <i>A. brasiliensis</i>		
DÍAS	CELULOSA	HDPE	PLA	CELULOSA	HDPE	PLA	CELULOSA	HDPE	PLA
2	3,0089	0,6934	2,4674	0,0000	0,1744	1,1960	0,6719	0,5246	2,6901
6	4,6805	1,0401	6,1976	8,0681	0,3489	2,4917	1,6799	0,6995	4,7850
7	6,0178	0,8667	7,7887	15,1277	0,8723	3,9869	2,3519	0,8744	6,8794
8	7,0208	1,0401	9,8789	16,1362	1,7447	6,2796	3,3598	1,1368	8,9738
9	7,6894	1,2134	11,5708	16,4724	1,7447	8,2730	5,3758	1,3991	10,7688
13	8,6924	1,2134	11,6710	18,6575	2,0064	9,5783	9,0716	2,2736	11,3662
15	9,3610	1,0401	11,4719	19,6660	2,0064	11,4928	11,0876	4,7221	12,1635
16	11,2667	1,3868	12,0198	20,6745	2,0064	13,3553	12,5995	5,1594	13,1098
19	12,2696	1,5948	14,4091	21,9856	2,5299	15,4770	17,6393	4,8096	14,8018
20	13,6069	1,5948	15,4052	23,1622	3,0533	17,7790	20,8312	4,7221	15,6483
21	14,9442	1,7682	16,5504	24,1707	3,7512	20,0719	23,1831	4,7221	16,6443
22	16,5156	2,0629	17,0589	24,9103	4,1699	22,1855	26,8118	5,0719	18,1269
23	17,9197	2,3229	17,8760	26,2550	4,6759	24,2393	29,3653	5,3342	19,0227
26	18,9227	2,2362	18,2744	27,5997	5,3738	26,3330	30,7093	5,2468	19,4711
27	20,5943	2,4962	18,8716	29,9529	5,8973	29,0246	31,8852	5,5091	20,4170

ANEXO I. CARACTERIZACIÓN LODO ACTIVO

PARAMETRO	RESULTADO	UNIDADES	METODO
Humedad	14,5	%	SM 2540 G Edición No. 22-2012
Solidos totales	85,5	%	SM 2540 G Edición No. 22-2012
PH en suelos a 18,9 °C	5,53	Unidades PH	EPA SW-846 9045 D-Revision 4-2004-ACREDITADO
Materia Organica	22,4	% BS	MT-PRE-043-SSSA Serie 5
Nitrogeno total Kjeldahl	4,00	% BS	MT-PRE-081-SSSA Serie 5
Fosforo total	8,12	% BS	MT-PRE-038 y SM 4500-P C Edición No. 22-2012
Arsénico	<9,00	mg/Kg-Bs	EPA 3051A- Revisión No. 1-2007 y EPA 6010C Revisión 3-2007
Cadmio	"5,10"	mg/Kg-Bs	
Cinc	1182	mg/Kg-Bs	
Cobre	457	mg/Kg-Bs	
Cromo	723	mg/Kg-Bs	
Mercurio	<4,00	mg/Kg-Bs	
Niquel	387	mg/Kg-Bs	
Plomo	"47"	mg/Kg-Bs	
Selenio	<9,00	mg/Kg-Bs	
<p><XX: Valor por debajo del límite de detección del metodo "XXX": Valor entre el límite de detección y el límite de cuantificación</p>			

Fuente. VASQUEZ ALEMAN, Juan Pablo y VARGAS MARTINEZ, Gabriela. Aprovechamiento de lodos planta de tratamiento de aguas residuales municipio de Funza, como insumo de cultivo y mejoramiento del suelo. Universidad Católica de Colombia, 2018. 41 p.

**ANEXO J.
CONCENTRACIÓN MÍNIMA INHIBITORIA PARA *A. BRASILIENSIS***

Test organism	Cu	Cd	Ni
<i>Aspergillus niger</i> (*GF-1)	318	56	117
<i>Pythyme</i> (GF-2)	127	56	235
<i>Aspergillus flavus</i> (GF-3)	191	112	176
<i>Aspergillus spp.</i> (GF-4)	32	56	59
<i>Aspergillus niger</i> (GF-5)	63.5	56	59
<i>Curvularia</i> (GF-6)	318	56	59
<i>Aspergillus bervipes</i> (GF-7)	191	112	59
<i>Aspergillus flavus</i> (**SF-4)	64	112	117
<i>Aspergillus niger</i> (SF-5)	445	1461	117
<i>Pythyme</i> (SF-1)	32	56	59

*Gujranwala fungi **Sialkot fungi

Fuente. AKHTAR, Shazia, *et al.* Metal tolerance potential of filamentous fungi isolated from soils irrigated with untreated municipal effluent. *Soil & Environment*. 2013, vol. 32, nro. 1. pp. 55-62

**ANEXO K.
MASA INICIAL Y FINAL DE LAS MUESTRAS**

TIPO DE INÓCULO	MASA INICIAL (g)	MASA FINAL (g)	
<i>A. brasiliensis</i>	Celulosa	2,019	1,7938
	HDPE	2,019	2
	PLA	2,0057	1,8873
	PLA (réplica #1)	2,007	1,898
	PLA (réplica #2)	2,001	1,8926
Lodo activo	Celulosa	2,0079	1,6962
	HDPE	2,006	1,985
	PLA	2,0048	1,8773
	PLA (réplica #1)	2,010	1,8865
	PLA (réplica #2)	2,006	1,8672
Lodo activo bioaumentado con <i>A. brasiliensis</i>	Celulosa	2,009	1,7827
	HDPE	2,0012	1,981
	PLA	2,0068	1,8708
	PLA (réplica #1)	2,014	1,9254
	PLA (réplica #2)	2,0049	1,8981