



BENEMÉRITA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE PUEBLA

INSTITUTO DE CIENCIAS

POSGRADO EN CIENCIAS AMBIENTALES



“La Tierra no es de nosotros, nosotros somos de la Tierra”

Nanofibras biocatalíticas de quitosano para la degradación de retardantes de flama
como contaminantes orgánicos persistentes

TESIS

MAESTRO EN CIENCIAS AMBIENTALES

Presenta

JOSÉ LUIS GARCÍA ZAMORA

Director de tesis:

Dr. Eduardo Torres Ramírez

Diciembre 2019



BENEMÉRITA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE PUEBLA

INSTITUTO DE CIENCIAS

POSGRADO EN CIENCIAS AMBIENTALES



“La Tierra no es de nosotros, nosotros somos de la Tierra”

Nanofibras biocatalíticas de quitosano para la degradación de retardantes de flama
como contaminantes orgánicos persistentes

TESIS

MAESTRO EN CIENCIAS AMBIENTALES

Presenta

JOSÉ LUIS GARCÍA ZAMORA

Comité tutorial:

Director	Dr. Eduardo Torres Ramírez
Co-directora	Dra. Verónica Santacruz Vázquez
Tutora	Dra. Alía Méndez Albores
Integrante Comité Tutorial	Dra. Fabiola Avelino Flores
Integrante Comité Tutorial	Dr. Miguel Ángel Valera Pérez

Diciembre 2019

Agradecimientos

Quiero expresar mi eterna gratitud a todas las instituciones y personas que han participado en la realización de este trabajo por el apoyo y la confianza que en mi depositaron.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) le agradezco la beca recibida durante la Maestría con número 481743, sin la cual no hubiera sido posible llevar a cabo este proyecto, así como el apoyo brindado para la realización de la estancia de investigación académica en la Universidad de Santiago de Compostela, España.

Al Consejo de Ciencia y Tecnología del Estado de Puebla (CONCYTEP) por el apoyo económico brindado para la presentación y divulgación de esta investigación en la XXII Convención Internacional sobre Medio Ambiente y Desarrollo.

Se agradece a la Vicerrectoría de Investigación y Estudios de Posgrado (VIEP) por el apoyo otorgado para la conclusión de esta tesis dentro del Programa IV. Investigación y Posgrado; por apoyar a los programas de posgrado para lograr su incorporación al Padrón Nacional de Calidad. Indicador establecido en el Plan de Desarrollo Institucional 2017-2021.

A la Dirección de General de Desarrollo Internacional de esta casa de estudios por el apoyo complementario para realización de la estancia internacional de investigación académica.

Al Instituto de Ciencias ICUAP por todas las facilidades otorgadas en la gestión de los apoyos necesarios para la conclusión de esta investigación.

Y al Posgrado en Ciencias Ambientales por la confianza y el apoyo económico concedido en la realización de la movilidad internacional; así como, la labor de gestión que permitió consumir de forma satisfactoria este proyecto de investigación.

No puedo dejar de agradecer al Dr. Eduardo Torres Ramírez director de esta tesis, por haberme brindado la oportunidad y la confianza para realizar este proyecto. Gracias por ser tan generoso al compartir sus conocimientos, pero sobre todo hacerme saber que todo es posible si se trabaja con esfuerzo y dedicación. Gracias por su amistad.

A la Dra. Verónica Santacruz Vázquez codirectora de esta investigación, agradezco todo el apoyo brindo para llevar a término este proyecto, gracias por su confianza y generosidad, por su infinita alegría y disposición para trabajar. Gracias por sus consejos de vida.

Agradezco a la Prof. Dra. María Teresa Moreira Vilar, por todas las facilidades brindadas durante la estancia de investigación académica en la Escuela Superior de Ingeniería de la Universidad de Santiago de Compostela, España.

A la Dra. María de la Paz Elizalde por su apoyo en la identificación de productos de reacción; a la Dra. Diana Cárdenas y a la Dra. Mireya Tapia por su ayuda en las pruebas toxicológicas.

No puedo olvidar a mis compañeros y amigos del laboratorio, que hicieron más amenas las horas estrés y de trabajo entre risas, comidas e historias increíbles. Gracias por su amistad. Y a todas aquellas personas que de alguna manera han apoyado el desarrollo de este proyecto. Muchas gracias a todos.

Índice General

I.	INTRODUCCIÓN.....	1
II.	JUSTIFICACIÓN	4
III.	MARCO DE REFERENCIA	6
3.1.	MARCO TEÓRICO	6
3.1.1.	<i>Antecedentes.....</i>	6
3.1.1.1.	Contaminación del agua	6
3.1.1.2.	La complejidad en el tratamiento de aguas residuales.	7
3.1.1.3.	Tratamiento de aguas residuales en la Agenda 2030	12
3.1.1.4.	Marco de referencia DESSIN.....	15
3.1.1.5.	Contaminantes Orgánicos Persistentes	19
3.1.1.6.	Convenio de Estocolmo	23
3.1.1.7.	Retardadores de Flama	25
3.1.1.8.	Tetrabromobisfenol A	27
3.1.1.9.	Biocatálisis Ambiental	30
3.1.1.10.	Nanofibras biocatalíticas	31
3.2.	MARCO CONCEPTUAL	36
3.2.1.	<i>Tipo de investigación.....</i>	36
3.2.2.	<i>Paradigma</i>	36
3.2.3.	<i>Enfoque Epistemológico.....</i>	36
3.2.4.	<i>Teorías que soportan la investigación.....</i>	37
3.3.	MARCO LEGAL	37
3.3.1.	<i>Normatividad, leyes y reglamentos.....</i>	37
IV.	PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....	39
4.1.	PREGUNTAS DE INVESTIGACIÓN	39
V.	HIPÓTESIS	39
5.1.	HIPÓTESIS GENERAL	39
VI.	OBJETIVOS	39
6.1.	OBJETIVO GENERAL.....	39
6.2.	OBJETIVOS ESPECIFICOS	39
VII.	DISEÑO DE LA INVESTIGACIÓN	40
7.1.	LOCALIZACIÓN	40
7.2.	FASE DE CAMPO	40
7.2.1.	<i>Muestreo de Campo.....</i>	40
7.3.	FASE DE LABORATORIO.....	40
7.3.1.	<i>Diseño Experimental.....</i>	41
7.3.1.1.	Oxidación enzimática del TBBPA	41
7.3.1.2.	Conversión del TBBPA	42
7.3.1.3.	Determinación de constantes cinéticas.....	42
7.3.1.4.	Extracción e identificación de productos de reacción	42
7.3.1.5.	Determinación de la Biodegradabilidad	43
7.3.1.6.	Pruebas de Toxicidad.....	44
7.3.1.7.	Nanofibras de quitosano/alcohol polivinílico	45
7.3.1.8.	Caracterización fisicoquímica de las Nanofibras	45
7.3.1.8.1.	Microscopia Electrónica de Barrido	45

7.3.1.8.2.	Espectroscopia de Infrarrojo	46
7.3.1.8.3.	Calorimetría de Barrido Diferencial.....	46
7.3.1.9.	Inmovilización enzimática en NFsQ.....	46
7.3.1.10.	Cuantificación de adsorción por NFsQ-CPO	47
7.3.1.11.	Estabilidad operacional del sistema NFsQ-CPO.....	47
7.3.2.	<i>Descripción y toma de muestra de la PTAR Izúcar de Matamoros</i>	47
7.4.	VARIABLES RESPUESTA.....	48
7.4.1.	<i>Diseño Factorial</i>	48
7.4.2.	<i>Variables de entrada</i>	48
7.4.3.	<i>Variables de salida</i>	49
7.5.	ANÁLISIS ESTADÍSTICO	49
VIII.	RESULTADOS	50
8.1.	PLANTA DE TRATAMIENTO DE AGUAS RESIDUALES IZÚCAR DE MATAMOROS.....	50
8.2.	OXIDACIÓN ENZIMÁTICA DEL TBBPA MEDIANTE CLOROPEROXIDASA.....	61
8.3.	PRODUCTOS DE REACCIÓN	63
8.3.1.	<i>Identificación</i>	63
8.3.2.	<i>Biodegradabilidad</i>	64
8.3.3.	<i>Toxicidad</i>	66
8.4.	NANOFIBRAS DE QUITOSANO/ALCOHOL POLIVINÍLICO.....	70
8.4.1.	<i>Morfología</i>	70
8.4.2.	<i>Caracterización de las NFsQ</i>	73
8.4.2.1.	Espectroscopia de infrarrojo	73
8.4.2.2.	Calorimetría de Barrido Diferencial.....	75
8.5.	CARACTERIZACIÓN DEL SISTEMA NFsQ-CPO.....	77
8.5.1.	<i>Morfología</i>	77
8.5.2.	<i>Adsorción</i>	79
8.5.3.	<i>Actividad enzimática</i>	79
8.6.	OXIDACIÓN ENZIMÁTICA DEL TBBPA MEDIANTE NFsQ-CPO	80
8.7.	ESTABILIDAD OPERACIONAL DEL SISTEMA NFsQ-CPO	82
8.7.1.	<i>Estabilidad al pH</i>	83
8.7.2.	<i>Reusabilidad</i>	84
8.7.3.	<i>Degradación de TBBPA en muestras ambientales</i>	85
8.8.	MARCO DESSIN EN LA IMPLEMENTACIÓN DE LA PROPUESTA BIOTECNOLÓGICA.....	87
IX.	CONCLUSIONES.....	90
X.	REFERENCIAS	92

Índice de Tablas

Tabla 1. Metas e indicadores del ODS 6	13
Tabla 2. Primeros COP's y sus propiedades.....	21
Tabla 3. Planes de acción que conforman el PNI de México para la implementación del Convenio de Estocolmo.....	24
Tabla 4. Usos de los principales RFB	27
Tabla 5. Demanda total de RFB en toneladas métricas	27
Tabla 6. Propiedades Físicoquímicas del TBBPA.....	28
Tabla 7. Biocatálisis Ambiental en el tratamiento de efluentes industriales	30
Tabla 8. Uso de Nanofibras biocatalíticas en la remoción de contaminantes	32
Tabla 9. Parámetros de análisis y detección de TBBPA y productos de reacción.....	43
Tabla 10. Parámetros de las variables de diseño	48
Tabla 11. Plan de experimentación, diseño factorial 2 ³	49
Tabla 12. Límites máximos permisibles de descarga	55
Tabla 13. Análisis por HPLC-ESI/QTOF-MS para detección de TBBPA.....	60
Tabla 14. Productos de degradación enzimática del TBBPA por CPO.....	63
Tabla 15. Biodegradabilidad del TBBPA antes y después del tratamiento enzimático	65
Tabla 16. Parámetros experimentales de electrohilado.	70
Tabla 17. Comparación del rendimiento de inmovilización de enzimas en diferentes soportes.	80
Tabla 18. Comparación de la capacidad oxidativa de las NFsQ-CPO para TBBPA en muestras modelo y ambientales de diferente origen.....	86
Tabla 19. Caracterización físicoquímica parcial de muestras ambientales de agua	86
Tabla 20. Capacidades de la intervención tecnológica propuesta para el mejoramiento de la calidad del agua de la PTAR Izúcar de Matamoros.....	88
Tabla 21. Efectos de la intervención propuesta en las Presiones y Estado del Ecosistema.....	88
Tabla 22. Lista de servicios ecosistémicos relevantes para el caso asociada a los parámetros afectados del estado.....	89

Índice de Figuras

Figura 1. Esquema de la contaminación del agua donde se muestran los elementos causales y su papel en la comprensión o resolución del problema	7
Figura 2. Planta Tratadora de Aguas Residuales como interfase naturaleza-sociedad.	9
Figura 3. Estructura del marco de evaluación DESSIN	16
Figura 4. Etapas y pasos de la evaluación del marco de referencia DESSIN	18
Figura 5. Producción mundial de retardadores de flama	25
Figura 6. Mecanismo de acción química por captura de radicales de los RFH	26
Figura 7. Fuentes, distribución ambiental y vías de exposición del TBPPA.	30
Figura 8. Estructura de la quitina y el quitosano	34
Figura 9. Estructura del alcohol polivinílico	35
Figura 10. Estrategia experimental.....	41
Figura 11. Mapa de ubicación de la PTAR Izúcar de Matamoros	50
Figura 12. Diagrama de flujo de la PTAR Izúcar de Matamoros, Puebla y puntos de muestreo	52
Figura 13 a-g. Etapas en el tratamiento de aguas residuales en PTAR Izúcar de Matamoros.	53
Figura 14. Caracterización de agua superficial y residual tratada.....	56
Figura 15. Oxidación enzimática del TBBPA por CPO antes y después de la oxidación enzimática.	62
Figura 16. Cinética de reacción del TBBPA por CPO	63
Figura 17. Curvas dosis-respuesta para <i>Artemia salina</i> expuesta durante 24 h y 48 h a TBBPA y productos de reacción; temperatura 21 °C	67
Figura 18. Curvas dosis-respuesta para <i>Artemia salina</i> expuesta durante 24 h y 48 h a TBBPA y productos de reacción; temperatura 28 °C	68
Figura 19. Inyector de aguja y carrusel en el electrohilado de nanofibras.	72
Figura 20. Espectro infrarrojo de QS,PVA y NFsQ.....	75
Figura 21. Termogramas DSC para QS, PVA y NFsQ con rampa de calentamiento 10 °C/min y atmosfera de nitrógeno.....	76
Figura 22. Micrografías SEM a 5000X y 1000X, para nanofibras de quitosano activadas con glutaraldehído e inmovilizadas con CPO	78
Figura 23. Oxidación enzimática del TBBPA por NFsQ-CPO antes y después de 30 minutos de oxidación enzimática.....	81
Figura 24. Comparación de la estabilidad al pH de la enzima libre e inmovilizada	84
Figura 25. Reusabilidad de las NFsQ-CPO para la oxidación de TBBPA.....	85

I. INTRODUCCIÓN

Para contribuir a la mejora de la calidad de vida que la población mundial ha experimentado durante el último siglo, ha sido necesario desarrollar nuevos productos químicos cuyas consecuencias a mediano y largo plazo eran desconocidas en el momento de su fabricación; sin embargo, tras numerosas evidencias científicas se puso de manifiesto la peligrosidad de algunas de estas sustancias, entre las cuales se encuentran plaguicidas, dioxinas, furanos, colorantes, hidrocarburos aromáticos policíclicos, retardadores de flama, refrigerantes, etc.; y que debido a su baja capacidad de biodegradación, son bioacumulables, tóxicas y pueden ser difundidas largas distancias hasta regiones donde nunca fueron utilizadas ni producidas son denominadas contaminantes orgánicos persistentes (COP's) (PNUMA, 2011).

Algunos de estos compuestos están diseñados para reducir la inflamabilidad o demorar la propagación del fuego a lo largo y a través de la superficie del material con el que se mezclan; las cuales son características altamente apreciadas en los sectores industriales, así como en la fabricación de productos comerciales; es por esta razón que, los así llamados retardadores de flama (RF) han sido utilizados ampliamente en la protección de materiales de construcción, incluyendo estructuras metálicas, plásticos, fibras sintéticas y textiles, componentes electrónicos, cables, etc.; logrando reducir la tasa de incendios y accidentes al reducir la velocidad de propagación del fuego, así como la producción de humos y gases de combustión, minimizando así la pérdida de vidas y los costos económicos (Abou-Elwafa Abdallah, 2016).

Su uso es tan generalizado que en 2016 la demanda mundial alcanzó 2.6 millones de toneladas para los más de 175 diferentes RF, de las cuales se estima que 200,000 toneladas pertenecen a los RF bromados (Eljarrat & Barceló, 2011; Segev, Kushmaro, & Brenner, 2009); sin embargo, es su gran estabilidad y extensa distribución en casi todo tipo de productos, sumados a sus respectivos ciclos de vida útil (producción, aplicación, adquisición, uso, desecho y reciclado) es que se crea una ruta de acceso continua al medio ambiente con sus consecuentes efectos adversos (Birnbaum & Staskal, 2004; Malkoske, Tang, Xu, Yu, & Wang, 2016).

Es por su ubicuidad y efectos negativos a la salud y al medio ambiente que se han comenzado a estudiar más detalladamente; esto ha llevado a la generación de medidas legislativas para la regulación de la producción, exposición, tratamiento y sustitución de los RF, ya que a medida que estos se desprenden de los materiales que los contienen contaminan los diferentes compartimientos ambientales (Eljarrat & Barceló, 2011; Malkoske et al., 2016).

Estudios recientes han demostrado la presencia de diferentes concentraciones de estos compuestos en el 100% de las muestras de aguas superficiales de lagos y ríos en Albania, Grecia, Italia, Noruega, Portugal, España, Reino Unid, China y Estados Unidos en concentraciones de 0.43 – 867 ng/L (Andresen & Bester, 2006; Aznar-Alemany et al., 2018; Segev et al., 2009), así como en aguas procedentes de plantas de tratamiento de aguas residuales en China 305 – 1,202 ng/L; Nueva York 30.1 – 69.8 µg/L; y España (Corazzari et al., 2015; Cristale, García Vázquez, Barata, & Lacorte, 2013; Kim, Oh, & Kannan, 2017; Segev et al., 2009; Wei et al., 2015; Yu et al., 2017).

Actualmente el tratamiento de estos compuestos presentes en diferentes matrices se ha realizado empleando métodos convencionales (químicos, fisicoquímicos y biológicos) los cuales resultan poco satisfactorios, debido a que los RF persisten aún después de su aplicación, por lo que se requiere el desarrollo de tecnologías sustentables para removerlos. Por lo anterior es importante identificar y evaluar la eficiencia de otras tecnologías para su tratamiento, con el fin de proponer alternativas que permitan su presencia a un bajo costo económico, energético y ambiental.

En este trabajo se propone la aplicación de tecnología biológica para el tratamiento de mitigación de estos contaminantes, como una tecnología eficiente y amigable con el medio ambiente. El desarrollo del tema incluye la construcción de un marco teórico en donde se abordarán las generalidades de la contaminación por COP´s. Además, se resume la estrategia internacional conocida como Convenio de Estocolmo, para contribuir a entender y resolver el problema ambiental de los COP´s y los RF en particular, entre ellas la aplicación de tecnologías sustentables de tratamiento. Posteriormente se describen a mayor detalle la tecnología conocida como Biocatálisis Ambiental, y el

enfoque planteado para aplicarla en la transformación de los RF a compuestos no tóxicos. Se explicarán sus ventajas y desventajas, su potencial y sus limitaciones para la su eventual aplicación.

II. JUSTIFICACIÓN

Si bien los RF pueden salvar y prevenir daños materiales, existe una creciente preocupación sobre sus impactos medioambientales y efectos sobre la salud debidos a su ubicuidad, persistencia, biodisponibilidad y algunos indicios sobre posibles efectos adversos como neurotoxicidad, disrupción endocrina y carcinogénesis (Moreira, Goncalves, & Beretta, 2013); sin embargo, el impacto o los efectos de la mayoría de estos compuestos todavía se encuentran en estudio; así mismo, la normatividad existente en materia de regulación del uso o comercialización que contribuya a incrementar la prevención de la contaminación también se encuentra limitada o nula para la gran mayoría de RF.

Es por estas razones que es necesario la implementación de tecnologías de tratamientos para mitigar el problema en los compartimientos donde han impactado estos compuestos. Los tratamientos convencionales han mostrado ser parcialmente exitosos en la eliminación de estos compuestos, adicionalmente, estos métodos aún se encuentran limitados debido a la generación de contaminantes secundarios, tiempos largos de operación, técnicas complejas y elevados costos de equipo y operación (Bes-Monge, Silva, & Bengoa, 2015; Forero, Ortiz, & Rios, 2005).

Por tal motivo surge la necesidad de aplicar tecnologías innovadoras sustentables como la biocatálisis ambiental, la cual consiste en la aplicación de biocatalizadores libres o inmovilizados para la transformación de sustancias contaminantes, con el fin de lograr la reducción o eliminación del impacto ambiental de estas últimas. La biocatálisis ambiental es amigable con el medio ambiente, además de que presenta elevada eficiencia de transformación, así como la posibilidad de reutilizar el biocatalizador si se encuentra inmovilizado. Algunos estudios han demostrado que la incorporación de los biocatalizadores a nanomateriales mejora su estabilidad y resistencia a condiciones más agresivas de reacción optimizando el rendimiento del biocatalizador en la degradación de clorofenoles, bisfenoles, anilinas, fármacos, y otros contaminantes (Wong, Dai, Talbert, Nugen, & Goddard, 2014; Xu, Tang, Liu, Li, & Zhang, 2015).

Es por lo anteriormente expuesto que la generación de información técnico-científica que permita comprender la problemática ambiental de los RF y generar el desarrollo de tecnologías sustentables que contribuyan a la eventual eliminación de estos contaminantes contribuirá a disminuir el impacto ambiental provocado por estos compuestos.

III. MARCO DE REFERENCIA

3.1. Marco Teórico

3.1.1. Antecedentes

3.1.1.1. *Contaminación del agua*

Se define como contaminación a la presencia en el ambiente de uno o más sustancias, organismo y formas de energía que no pertenecen, o que se encuentran presentes en concentraciones mayores que la natural en un ecosistema, causando su desequilibrio como consecuencia de esta perturbación que no ha sido eliminada (Castillo, 2005; SEMARNAT, 2012).

En la actualidad, la contaminación atiende múltiples orígenes y fuentes, siendo una causa importante de graves trastornos ambientales y daños a la salud que se incrementan con la población (Albert, 1997). Las principales causas, tanto para el agua dulce como la salada, son los vertidos incontrolados de las aguas residuales urbanas e industriales, muchas veces sin tratamiento, así como las prácticas agrícolas deficientes, la contaminación atmosférica, la acumulación de sustancias químicas en suelos y sedimentos, el exceso de bombeo de aguas subterráneas, la destrucción de zonas pantanosas, la minería y otras industrias de extracción también contribuyen a su deterioro.

De esta forma, se puede considerar que casi todos los usos pueden contaminar el recurso y convertirlo en no disponible para otros usos, siendo indispensable un tratamiento adecuado (Lattemann, Kennedy, Schippers, & Amy, 2010). Es así que la contaminación de aguas se ha convertido en un problema que va en aumento y que puede ser considerado como uno de los principales problemas ambientales (Fenner, 2017). En la Figura 1 se representa los elementos que intervienen en la contaminación del agua.



Figura 1. Esquema de la contaminación del agua donde se muestran los elementos causales y su papel en la comprensión o resolución del problema (Elaboración propia, 2018).

3.1.1.2. *La complejidad en el tratamiento de aguas residuales.*

Dentro de la problemática de la contaminación del agua, un componente esencial es la planta de tratamiento. Para el abordaje de las plantas de tratamiento (PTAR) desde las ciencias ambientales, se considera el enfoque de sistemas complejos, la tecnología, química y salud ambiental. El enfoque de los sistemas complejos permitirá observar al sistema de tratamiento como una totalidad organizada, identificar sus elementos y las interacciones entre los mismos. Para ello, se requiere el enfoque y aplicación de variadas disciplinas (como las mencionadas en la Figura 1) que ayuden en la generación de soluciones innovadoras desde la Tecnología Ambiental; al entendimiento de los impactos de la contaminación y su deficiente tratamiento en la salud humana y ambiental, enfoques proveídos por la química y la salud ambiental respectivamente.

Para su evaluación, la PTAR será considerada el sistema de estudio, ya que pueden identificarse y definirse las características que define a un sistema ambiental. El

enfoque de sistemas complejos permite observar e identificar un sistema como una estructura compleja que se auto organiza, en donde intervienen diferentes componentes que además de interactuar se interrelacionan entre sí, creando una sinergia interdependiente. Todo sistema comprende cinco elementos importantes (componentes, interacciones, entradas, salidas y límites), que es necesario identificar para ir adentrándose en el análisis de un sistema complejo, -en este caso, la planta de tratamiento-, que implica interdependencia, interrelación, no linealidad, auto organización, emergencia, entre otros (Hart, 1985; García, 2006).

De acuerdo con Rojas-Remis y Mendoza-Espinosa (2014), en las plantas de tratamiento de aguas residuales (PTAR) una vez que comienza la fase de operación se generan nuevos procesos no previstos y la relación dependiente de sus subprocesos o subsistemas exige su análisis desde la complejidad para encontrar estrategias factibles de resolución a los nuevos impactos sociales y ambientales generados.

Las PTAR emiten gases que se mezclan con el aire y que, al combinarse con las condiciones atmosféricas locales, pueden generar olores que molestan a los habitantes cercanos a estas (Garcés et al., 2008). Adicionalmente los lodos residuales derivados del proceso de tratamiento representan un problema de manejo y disposición final que genera contaminación ambiental y suele implicar cerca del 45% del gasto anual para los operadores (Onyeche, 2010).

Debido a esto, la operación de las PTAR no sólo debe considerar el tratamiento de las aguas residuales para cumplir con la normatividad vigente para que estas puedan ser descargadas a cuerpos de agua o ser reutilizadas, sino que se debe considerar la operación como un todo, es decir, incluyendo los problemas sociales y ambientales que se generan, con la finalidad de buscar y proponer posibles soluciones.

El tratamiento de las aguas residuales permite elevar el nivel de calidad de vida de la sociedad evitando las enfermedades de origen hídrico generadas por el contacto directo o indirecto con el agua residual. De manera general, la Organización de las Naciones Unidas para la Educación, la Ciencia y la Cultura (UNESCO) ha propuesto dos métodos complementarios para enfrentar los problemas relacionados con la

contaminación causada por las aguas residuales. El primero implica reducir el uso excesivo del recurso agua y evitar su contaminación desde el primer uso (principio precautorio), lo que reduce el volumen global de las aguas residuales producidas, así como su carga contaminante. El segundo involucra la recolección de aguas residuales y la aplicación de niveles adecuados de tratamientos para su descarga al medio ambiente (remediación), lo cual incluye establecer normas y niveles de calidad para los flujos de aguas residuales entrantes y aguas residuales tratadas salientes de las PTAR (UNESCO, 2017).

Es por este segundo aspecto que la importancia de las PTAR radica en su capacidad de depuración de las aguas residuales, sirviendo de interfase entre la sociedad y el medio ambiente, ya que el vertido de las aguas residuales sin tratar o con tratamiento inadecuado tendrá consecuencias a la salud humana por la reducción de la calidad del agua; efectos ambientales negativos debido a la degradación de los recursos hídricos; así como efectos en las actividades económicas. Figura 2.

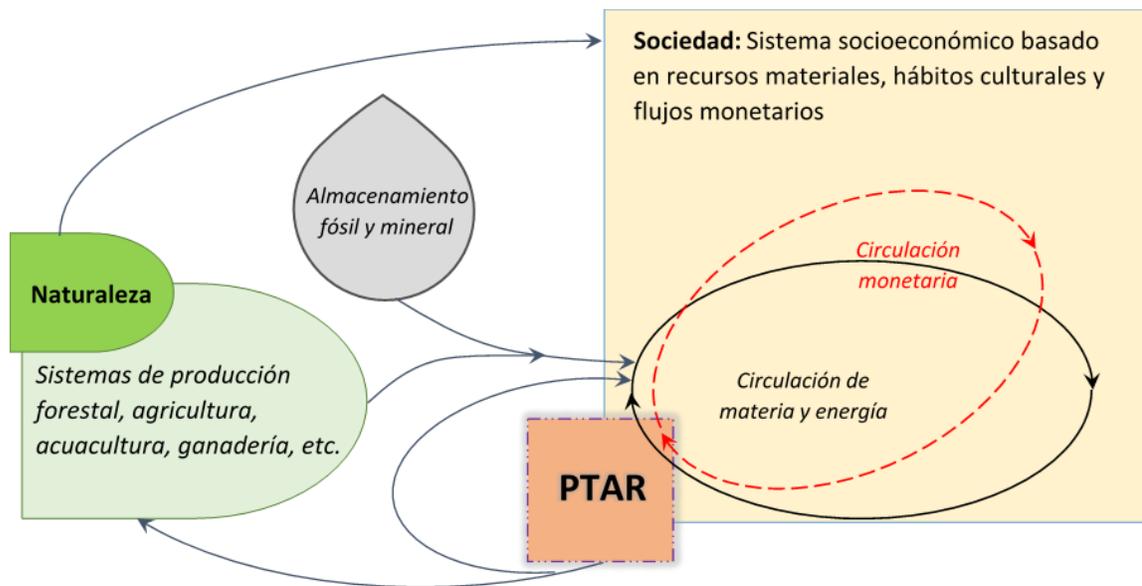


Figura 2. Planta Tratadora de Aguas Residuales como interfase naturaleza-sociedad (Adaptado de Grönlund et al., 2013).

Sin embargo, uno de los principales motivos por los que el tratamiento de aguas residuales ha generado poco interés, es que a menudo no se ha considerado la verdadera dimensión del costo económico de dejar de invertir en infraestructura, investigación y

saneamiento de aguas residuales (UNESCO, 2017). De acuerdo con la Organización de las Naciones Unidas (ONU, 2017), los efectos negativos al medio ambiente y a la salud humana se han acrecentado de forma proporcional al incremento de las aguas residuales vertidas sin tratamiento alrededor del mundo.

De manera global, la gestión de aguas residuales y saneamiento se considera una actividad costosa y con uso intensivo de capital, ya que la construcción de las PTAR implica una gran inversión económica inicial, generalmente de millones de dólares en función del caudal a tratar (Eugenia, Peña, & Ducci, 2013). Y una vez en operación, estos sistemas rara vez generan ingresos importantes y, por lo tanto, no pueden cubrir sus propios costos de operación y mantenimiento a mediano y largo plazo, siendo la energía eléctrica el principal insumo en la operación de las PTAR con cerca del 70% de los costos de operación (CONAGUA, 2017), lo que lleva a un rápido deterioro de sus instalaciones con la consecuente disminución de su capacidad de tratamiento o su inactividad. Es por lo anterior que la inversión en el tratamiento de aguas residuales no se ha considerado prioridad política en muchas economías en desarrollo (UNESCO, 2017).

La falta de financiamiento es un impedimento importante en la aplicación de tratamientos adecuados y eficientes, pues el elevado costo de las tecnologías de punta dificulta su aplicación generalizada, especialmente en países en vías de desarrollo (Daigger, 2011). Esta situación se ve favorecida debido a la falta de información actualizada referente a la contaminación por aguas residuales, sumado a la baja vinculación entre el sector académico, los centros de investigación, la industria y los gobiernos.

Es en este contexto, que los contaminantes emergentes, incluidos los COP's, presentan un claro vacío en conocimiento e investigación sobre los niveles de ocurrencia de estos últimos en aguas residuales y cuerpos de agua; por lo cual, es necesario comprender íntegramente el ciclo de vida de estos contaminantes en los recursos hídricos y el ambiente, para su posterior mitigación y eliminación de los diferentes compartimentos ambientales.

No obstante, no debe subestimarse la dimensión social, pues se requiere de la comprensión y participación de las partes interesadas en el saneamiento de las aguas residuales. Algunas acciones como las campañas de concientización pueden ayudar a sensibilizar a los ciudadanos sobre las formas en que el agua puede contaminarse, la importancia de las PTAR y los riesgos y beneficios que implica el uso de aguas residuales tratadas.

Además, es fundamental promover la creación de capacidades organizativas e institucionales (procesos de planificación, coordinación, toma de decisiones, etc.) que permitan elaborar planes de acción nacionales, regionales o locales que protejan el medio ambiente y garanticen el tratamiento adecuado de las aguas residuales, ya que si las instituciones a cargo de la operación y mantenimiento de las PTAR no cuentan con la capacidad institucional adecuada, se pone en riesgo la función de dichos sistemas (Murray y Drechel, 2011). En este sentido, es necesario abordar la gestión de las aguas residuales desde los puntos de vista científico, social, ambiental, económico y político, que puedan hacer frente a los problemas que surgen en las interconexiones de la operación de las PTAR haciendo especial énfasis en los riesgos a la salud humana y al medio ambiente.

Por último, una adecuada regulación debe ser adecuada a la región y flexible en él tiempo, permitiendo reconocer las diferencias económicas, políticas y socioculturales (Hernández-Sancho, Lamizana-Diallo, Mateo-Sagasta, & Qadir, 2015); esta flexibilidad permite tomar en cuenta los costos y beneficios a lo largo de toda la vida útil de la PTAR, elevando paulatinamente la calidad del agua. Para lograr un marco regulatorio eficaz es indispensable que la autoridad a cargo posea los conocimientos técnicos y de gestión adecuados, que actúe de manera independiente y que cuente con las facultades necesarias para ejecutar normas y lineamientos referentes a calidad del agua y su uso o reúso en las diferentes actividades económicas.(UNESCO, 2017).

Si bien es cierto que el costo de construcción, operación y mantenimiento de una PTAR es elevado, este deberá de compararse con diferentes beneficios ambientales, económicos y socioculturales que se obtienen de la gestión adecuada de aguas residuales, especialmente en zonas de elevada presión hídrica (particularmente en áreas

urbanas), cuando se compare con el costo de construcción de una nueva represa, la importación de agua limpia desde otra cuenca o el ahorro económico a los sistemas de salud causados por enfermedades hídricas (Hernández-Sancho et al., 2015). Mejorar la gestión de las aguas residuales, por lo tanto, requiere la coordinación de los diferentes actores involucrados para poder incrementar la calidad de los recursos hídricos, al tiempo que se maximizan los beneficios en los distintos sectores involucrados en la gestión de estas aguas.

En relación con lo planteado anteriormente, es de esperar que uno de los objetivos de la Agenda 2030 para el Desarrollo sostenible tenga como prioridad garantizar la disponibilidad, el acceso al agua y su saneamiento.

3.1.1.3. *Tratamiento de aguas residuales en la Agenda 2030*

El 25 de Septiembre de 2015, 193 países miembros de la Asamblea General de las Naciones Unidas adoptaron la Agenda 2030 para el Desarrollo Sostenible que incluye 17 Objetivos (ODS), cada uno con metas específicas a alcanzar en un periodo de 15 años (ONU, 2015), con la finalidad de poner fin a la pobreza, proteger el medio ambiente y garantizar la prosperidad para todos.

De manera particular, para el agua, la Agenda 2030 hace un llamado a mejorar la gestión de los recursos hídricos de manera amplia inclusiva e integrada haciendo énfasis en 1) agua potable, 2) saneamiento e higiene, 3) calidad del agua y aguas residuales, 4) eficiencia en el uso del agua y escases, 5) gestión integrada del agua, 6) protección de los ecosistemas y 7) cooperación internacional y participación de las partes interesadas en la gestión de los recursos hídricos (UNESCO, 2017), ver Tabla 1.

Tabla 1. Metas e indicadores del ODS 6 (ONU, 2015)

ODS 6	
Garantizar la disponibilidad de agua y su gestión sostenible y el saneamiento para todos	
META	INDICADORES
6.1 Para 2030, lograr el acceso universal y equitativo al agua potable, a un precio asequible para todos.	Proporción de la población que utiliza servicios de agua potable administrada de forma segura.
6.2 Para 2030, lograr el acceso equitativo a servicios de saneamiento e higiene adecuados para todos y poner fin a la defecación al aire libre, prestando especial atención a las necesidades de las mujeres y las niñas y las personas en situación vulnerable.	Proporción de la población que utiliza servicios de saneamiento administrados de forma segura que incluyan instalaciones para lavarse las manos, agua y jabón.
6.3 Para 2030, mejorar la calidad del agua mediante la reducción de la contaminación, la eliminación de vertimiento y la reducción al mínimo de la descarga de materiales y productos químicos peligrosos, la reducción a la mitad del porcentaje de aguas residuales sin tratar y un aumento sustancial del reciclado y la reutilización en condiciones de seguridad a nivel mundial.	Proporción de aguas residuales tratadas de manera segura. Proporción de las masas de agua con buena calidad de agua ambiental.
6.4 Para 2030, aumentar sustancialmente la utilización eficiente de los recursos hídricos en todos los sectores y asegurar la sostenibilidad de la extracción y el abastecimiento de agua dulce para hacer frente a la escasez de agua y reducir sustancialmente el número de personas que sufren de escasez de agua.	Cambio con el tiempo en la eficiencia en el consumo de agua. Nivel de estrés hídrico; extracción de agua dulce en proporción a los recursos de agua dulce disponible.
6.5 Para 2030, poner en práctica la gestión integrada de los recursos hídricos a todos los niveles, incluso mediante la cooperación transfronteriza, según proceda.	Grado de aplicación de la gestión integrada de los recursos hídricos (0-100). Proporción de zonas de cuencas transfronterizas para las que existe un acuerdo operacional de cooperación en materia de recursos hídricos.
6.6 Para 2020, proteger y reestablecer los ecosistemas relacionados con el agua, incluidos los bosques, las montañas, los humedales, los ríos, los acuíferos y los lagos.	Cambio con el tiempo de la extensión de los ecosistemas relacionados con el agua.
6.a Para 2030, ampliar la cooperación internacional y el apoyo prestado a los países en desarrollo para la creación de capacidad de actividades y programas relativos al agua, la desalinización y el aprovechamiento eficiente de los recursos hídricos, el tratamiento de aguas residuales y las tecnologías de reciclaje y reutilización.	Cuantía de la asistencia oficial para el desarrollo relacionada con los recursos hídricos y el saneamiento que forma parte de un plan de gastos coordinado por el gobierno.
6.b Apoyar y fortalecer la participación de las comunidades locales en mejora de la gestión del agua y saneamiento.	Proporción de unidades administrativas locales con políticas y procedimientos establecidos y operativos para la participación de las comunidades locales en la gestión de los recursos hídricos y saneamiento.

De acuerdo con la tabla anterior, la meta 6.3 de los ODS es la más estrechamente relacionada con la gestión de las aguas residuales, y para medir su progreso se han propuesto dos indicadores: 1) proporción de aguas residuales tratadas de forma segura y 2) proporción de las masas de agua con buena calidad de agua ambiental.

Uno de los retos más importantes para el monitoreo del progreso de esta meta, es de acuerdo con la UNESCO (2017), la falta de datos relativos en prácticamente todos los aspectos de la calidad del agua y la gestión de las aguas residuales, particularmente en los países en vías de desarrollo. De ahí, la importancia de generar información técnico-científica que permita comprender las diferentes causas de la contaminación del agua. Esta información generará datos confiables que permita a los sectores públicos y privados participar en la toma de decisiones en todos los niveles. Para ello, se requieren inversiones en infraestructura y tecnología apropiadas que permitan incrementar la calidad de las aguas residuales tratadas; además de desarrollar capacidades institucionales para el monitoreo, control de la calidad y gestión de los recursos hídricos.

De acuerdo con UNESCO (2017), el bajo nivel de tratamientos secundarios y avanzados en aguas residuales en los países en vías de desarrollo reflejan la necesidad urgente de contar con actualizaciones tecnológicas para el tratamiento de aguas residuales y opciones de uso seguro que permitan favorecer la meta 6.3 de los ODS.

En este contexto, en México, la infraestructura hidráulica actual permite tratar el 63% de las aguas residuales municipales (CONAGUA, 2018). Mientras que en el Informe Nacional Voluntario de 2018 para el Foro Político de alto nivel sobre Desarrollo Sostenible, se plantea que los desafíos a vencer para el cumplimiento de la meta 6.3 de los ODS son: el financiamiento para infraestructura hidráulica adecuada que considere costos y beneficios socioambientales, así como costos de operación y mantenimiento; mejorar la regulación de los servicios de saneamiento a nivel municipal; asegurar la recolección completa del agua, el tratamiento de aguas residuales y su correcta disposición en cuerpos de agua que no afecten su calidad y los ecosistemas vinculados; incrementar la reutilización del agua en la industria, en los servicios municipales y en la recarga de acuíferos; así como, la creación de una Ley General de Aguas que contemple la gestión participativa, sostenible y productiva del agua, de suerte que permita la

realización del derecho humano al agua, así como su saneamiento e higiene (SEGOB, 2018).

Son estos desafíos los que evidencian que la calidad del agua, su abastecimiento y uso sostenible, así como los ecosistemas relacionados con el agua son sistemas interdependientes. Por ello, se debe propiciar las condiciones de saneamiento que permitan un aumento en el tratamiento de las aguas residuales que contribuyan a la mejora de la calidad del agua, garantizando así ecosistemas saludables (ONU, 2015); sin embargo, estos desafíos pueden ser altamente complejos en las zonas urbanas, donde pueden agravarse por el aumento de los niveles de población y las infraestructuras de agua potable y residuales (Koop & van Leeuwen, 2017)

En consecuencia es que durante los últimos años, se han desarrollado diferentes marcos de referencia para la mejora de la administración de los Servicios Ecosistémicos (SE) y en particular para gestión integral de los recursos hídricos, a menudo con un enfoque especial en las zonas urbanas, en donde comúnmente se incluyen nuevas técnicas que permitan la disminución de las presiones e impactos hacia dichos recursos, entre las cuales se encuentran el desarrollo de técnicas para la recarga del agua subterránea, así como las intervenciones tecnológicas para la mejora de los tratamientos que reciben las aguas residuales municipales e industriales en las PTAR

3.1.1.4. *Marco de referencia DESSIN*

Para poder valorar eventualmente los efectos de una intervención tecnológica de mitigación es necesario tomar en cuenta la gama completa de posibles impactos o mejoras en el ecosistema, por ejemplo, los beneficios que la población percibe de su interacción con la naturaleza. Es por ello que, para evaluar los cambios en los SE asociados a soluciones tecnológicas o de gestión implementadas a los cuerpos de agua a nivel subcuenca, Anzaldúa et al. (2018) desarrollaron el marco de referencia DESSIN (Demonstrate Ecosystem Services Enabling Innovation in the Water Sector) para la evaluación práctica de las intervenciones antes mencionadas en ecosistemas de agua dulce para la Unión Europea. Dicho marco se basa en el Sistema de Clasificación Internacional Común de los Servicios Ecosistémicos (CICES, por sus siglas en inglés)

desarrollados por Haines-young, Potschin, & Haines-young (2012) y el Sistema de Manejo Adaptativo de Fuerza Motriz – Presión – Estado – Impacto - Respuesta (DPSIR por sus siglas en inglés) creado por la Agencia Europea de Medio Ambiente (1999).

El modelo DESSIN permite a sus usuarios evaluar los cambios en los SE relacionados con las medidas implementadas en un sistema de agua dulce dado, enfocando dicha evaluación a nivel local para poder asociar intervenciones a pequeña escala a posibles impactos ambientales, económicos y sociales. Este modelo ofrece, además, la ventaja de permitir la formulación de argumentos cualitativos que pueden ser útiles en la toma de decisiones cuando la cuantificación de los SE no es posible, facilitando así, el análisis de escenarios y la comparación de diferentes soluciones (Anzaldúa et al., 2018).

Como se mencionó con anterioridad, en este modelo se considera a cualquier innovación tecnológica o su implementación como una respuesta y se encuentra ubicada en el centro del marco debido a que esta respuesta puede influir en las fuerzas motrices, las presiones o el estado del sistema en estudio o en una combinación de los tres (ver Figura 3); por su parte, los Impactos dentro de este marco DESSIN son dividido en dos tipos: el Impacto I que tiene que ver con el rango y la escala en el que el SE está disponible y el Impacto II que hace referencia a los beneficios percibidos y el valor resultante de la utilización real del SE (Anzaldúa et al., 2018).

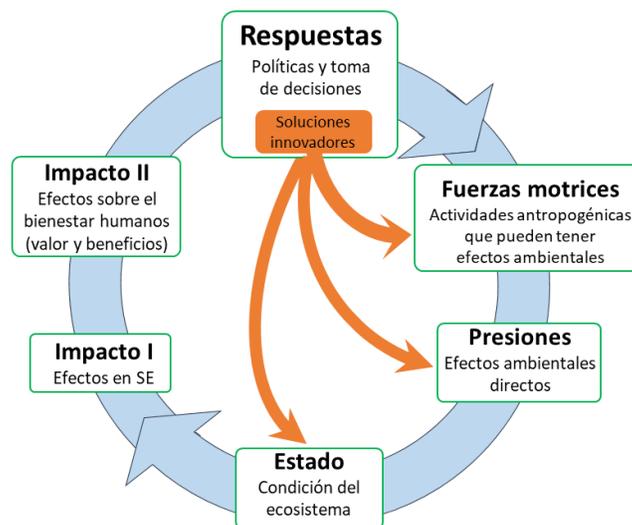


Figura 3. Estructura del marco de evaluación DESSIN (adaptado de Anzaldúa et al., 2018).

A continuación, se describe de forma general las cinco partes necesarias para ejecutar una evaluación utilizando el marco DESSIN.

- i. *Descripción del estudio:* Permite al evaluador establecer la zona de estudio, incluyendo sus límites físicos, así como y los objetivos de la evaluación. Esta etapa se debe elaborar una lista de las partes interesadas ubicadas dentro del área de estudio lo que permite identificar a los beneficiarios de la intervención.
- ii. *Caracterización del problema:* Tiene como objetivo identificar y describir las fuerzas motrices (actividades antropogénicas que pueden tener un efecto ambiental) y las presiones (efectos ambientales directos que resultan de las actividades humanas).
- iii. *Capacidad de respuesta al cambio e identificación de beneficiarios potenciales:* Su objetivo es identificar las respuestas (Intervención tecnológica, gestión, medidas políticas o una combinación de estas que tienen como objetivo mejorar el estado del ecosistema en estudio) que se pueden implementar para abordar los problemas en el área de estudio y determinar los SE y beneficiarios relevantes para el caso.
- iv. *Evaluación del impacto:* Tiene por objetivo medir el impacto de la respuesta cuantificando el estado del ecosistema antes y después de la intervención mediante el uso de indicadores adecuados en la provisión del o los SE (Impacto I) y en el uso de los SE por los beneficiarios (Impacto II), lo que permite revelar el impacto de la respuesta.
- v. *Evaluación de la sostenibilidad:* Son un conjunto de pasos que tienen por objetivo poner en perspectiva los cambios evaluados en los SE al considerar otros aspectos de la sostenibilidad (aspectos sociales, ambientales, financieros, gubernamentales, etc.) que permitan comparar posibles ventajas y desventajas de la respuesta.

La figura 4 esquematiza el procedimiento descrito para una mejor explicación del marco DESSIN

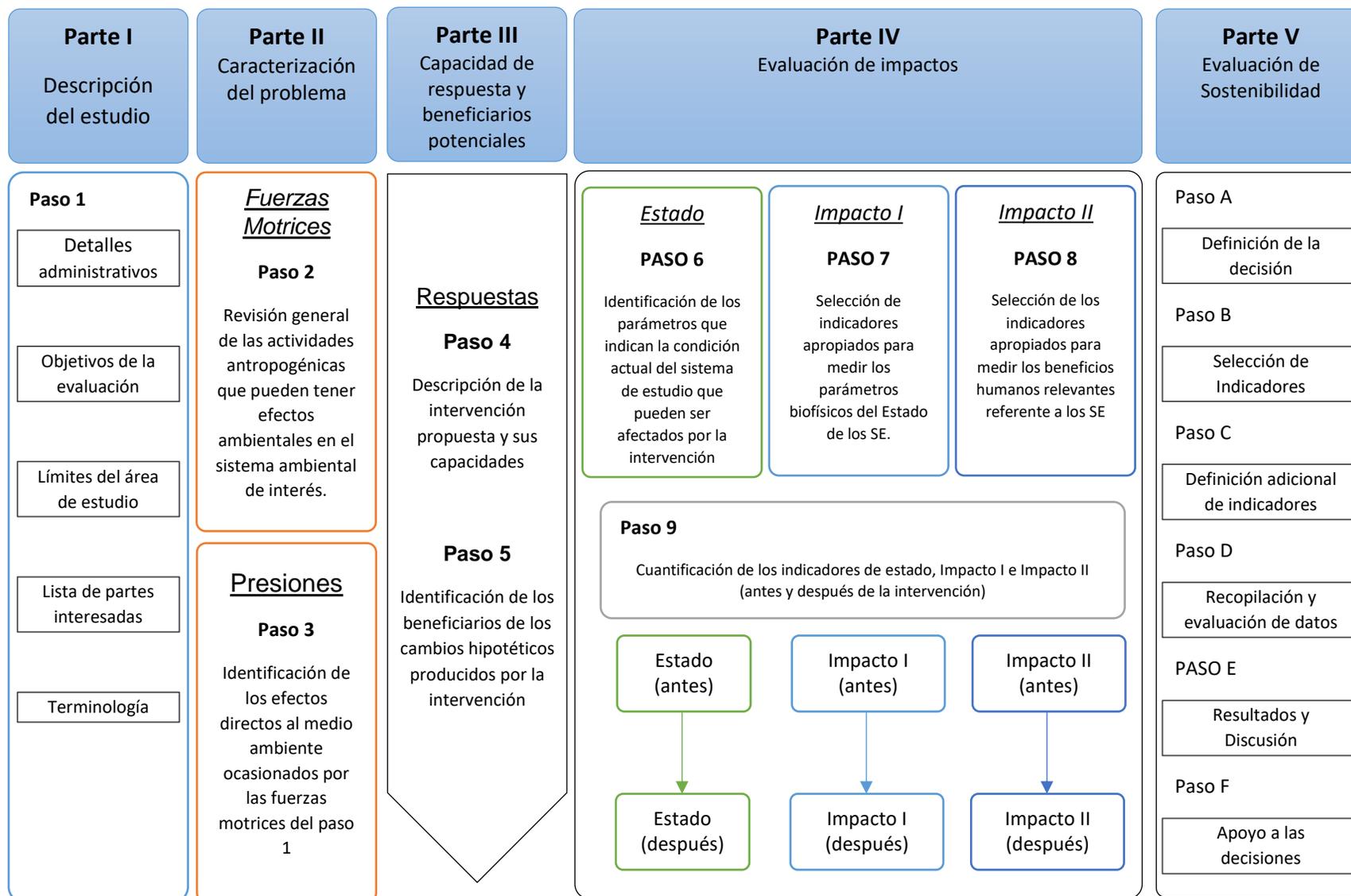


Figura 4. Etapas y pasos de la evaluación del marco de referencia DESSIN (adaptado de Anzaldúa et al., 2018).

3.1.1.5. *Contaminantes Orgánicos Persistentes*

De acuerdo con el Programa de las Naciones Unidas para el Medio Ambiente (UNEP por sus siglas en inglés), los contaminantes orgánicos persistentes (COP's) son compuestos que, por sus características fisicoquímicas resisten en grado variable la degradación fotoquímica, química y biológica, lo que causa que su vida media en el ambiente sea larga, siendo en su gran mayoría compuestos xenobióticos (Domínguez-Guilarte et al., 2011; UNEP, 2011), sus principales características son:

- a. *Persistencia*: estabilidad a la degradación química o biológica, lo que supone una larga vida de estos. El criterio de persistencia establecido en el Convenio de Estocolmo se basa en la permanencia de la sustancia en agua, suelo, sedimentos o aire por encima de un tiempo determinado.
- b. *Bioacumulables*: se acumulan en los tejidos corporales de los organismos en concentraciones mayores que las ambientales debido a su naturaleza; se incorporan a la cadena alimenticia, provocando consecuencias en las especies superiores de la cadena trófica. El criterio de bioacumulación establecido en el Convenio de Estocolmo se basa en la superación de umbrales de bioacumulación preocupante para las especies y en la toxicidad o ecotoxicidad de la sustancia.
- c. *Tóxicos*: tienen el potencial para causar daños a la salud humana y/o a los ecosistemas; entre los daños que ocasionan a los diferentes seres vivos se encuentran alteraciones del sistema endocrino, trastornos congénitos, daño del sistema inmunológico y respiratorio, alteraciones dermatológicas, pérdida de fertilidad, deformaciones, desórdenes de índole sexual, periodos de lactancia más cortos, además de ser potencialmente carcinógenos. El criterio de toxicidad establecido en el Convenio de Estocolmo se basa en la producción de efectos adversos en la salud humana o el medio ambiente y en datos de toxicidad y/o ecotoxicidad que indiquen el potencial de daño.
- d. *Móviles*: se distribuyen a grandes distancias desde la fuente de emisión a través del aire, el agua, o mediante especies migratorias, depositándose especialmente

en las regiones más frías de la tierra incluyendo aquellas como los océanos y zonas polares. El criterio de potencial transporte a larga distancia en el medio ambiente establecido en el Convenio de Estocolmo se basa en la detección de las sustancias en lugares alejados de la fuente de liberación y en la comprobación de que el transporte puede haber ocurrido por medio del aire, agua o especies migratorias.

Se han identificado sitios y personas contaminadas con COP's en todo el mundo, incluyendo los polos y los océanos, al punto de que se puede considerar que no existe un lugar libre de la contaminación de estos compuestos (ubicuidad); esto ha llevado a numerosas investigaciones a relacionar los COP's con una amplia gama de enfermedades en humanos y la disminución de muchas especies silvestres alrededor del mundo (Venegas Mata & Naranjo Aguilar, 2010).

En un esfuerzo de tratar esta problemática en mayo de 2001, en Estocolmo, Suecia, un total de 127 países adoptaron un tratado de las Naciones Unidas para prohibir o minimizar el uso de doce de las sustancias tóxicas más utilizadas en el mundo, consideradas causantes de cáncer y defectos congénitos en personas y animales. Los COP's objeto de este convenio incluyen ocho pesticidas, entre ellos el DDT, dos productos industriales y dos subproductos de diversos procesos de combustión, incluyendo los incendios accidentales de desechos y materiales plásticos: las dioxinas y los furanos (UNEP, 2011). En la tabla 2 se muestran los primeros COP's.

Tabla 2. Primeros COP's y sus propiedades (UNEP, 2011; Venegas Mata & Naranjo Aguilar, 2010).

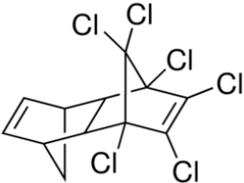
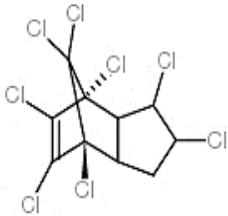
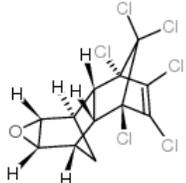
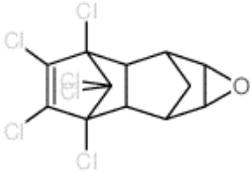
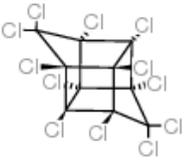
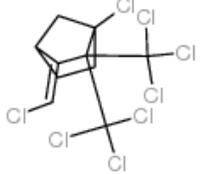
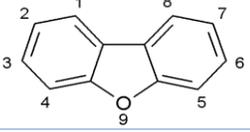
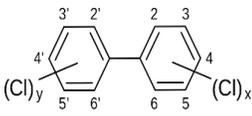
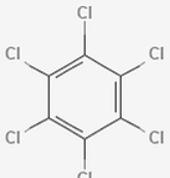
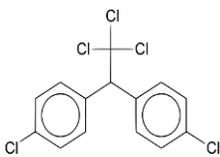
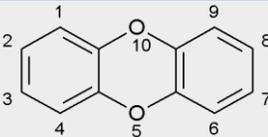
Anexo	Nombre	Estructura Química	Propiedades
A	Aldrin		Plaguicida organoclorado de alta toxicidad para los mamíferos y no mamíferos, por la bioacumulación de residuos en la cadena alimentaria y en los tejidos humanos. Es persistente y bioacumulable.
A	Clordano		Plaguicida bajo los nombres registrados de Octachlor® y Velsicol 1068®. La exposición al clordano ocurre principalmente al comer alimentos contaminados tales como tubérculos comestibles, carnes, pescados y mariscos, o al tocar tierra contaminada. Los niveles altos de clordano pueden dañar el sistema nervioso y el hígado.
A	Dieldrín		Compuesto es altamente tóxico por cualquier ruta de exposición. La exposición a los agentes neurotóxicos puede producir opresión del pecho, salivación excesiva, calambres abdominales, diarrea, visión borrosa, temblores y la muerte.
A	Endrín		La exposición a dosis altas puede causar dolores de cabeza, mareo, nerviosidad, confusión, náusea, vómitos, convulsiones, daño al sistema nervioso central y la muerte del organismo.
A	Mirex		La exposición a altos niveles puede dañar la piel, el hígado o los sistemas nervioso y reproductivo. Se pueden acumular en peces u otros organismos que viven en agua contaminada o que se alimentan de otros animales contaminados.
A	Toxafeno		El toxafeno es un pesticida cuyo uso en los Estados Unidos está actualmente prohibido. El toxafeno se acumula en el tejido adiposo de peces y mamíferos. Exposición a niveles elevados de toxafeno puede dañar el sistema nervioso, hígado, riñones, y causar la muerte.
C	Furanos		En seres humanos, es probable que cause irritación de la piel y los ojos, un aumento en la susceptibilidad a infecciones respiratorias y alteraciones del sistema nervioso.

Tabla 2. Primeros COP's y sus propiedades (UNEP, 2011; Venegas Mata & Naranjo Aguilar, 2010) Continuación.

Anexo	Nombre	Estructura Química	Propiedades
A	Bifenilos policlorados (PCB's)		Los PCB's ingresan al organismo a través de los pulmones, el tracto gastrointestinal y la piel. Por depender en mayor medida del pescado y de animales con cantidades elevadas de tejido adiposo, las poblaciones más expuestas a los PCB son las próximas a las regiones árticas.
A	Hexaclorobenceno (HCB)		La exposición breve a niveles altos de HCB puede causar úlceras en la piel, efectos del hígado y la tiroides, efectos sobre el sistema nervioso tales como debilidad, temblores y convulsiones; la exposición prolongada puede causar daño al hígado y al sistema reproductivo.
B	Dicloro-difenil-tricloroetano (DDT)		Pesticida usado extensamente en el pasado para controlar insectos en agricultura e insectos que transmiten enfermedades como la malaria. El DDT afecta el sistema nervioso, la lactancia, la reproducción y el hígado. Puede ser carcinogénico en seres humanos.
C	Dioxinas		La exposición a las dioxinas ocurre principalmente al ingerir alimentos contaminados con estas sustancias. Producen efectos en la piel y pueden producir cáncer en seres humanos.

Es de destacar que dentro de aquellos COP's de reciente prohibición y de mayor problemática se encuentran actualmente compuestos retardadores de flama (RF), los cuales también han sido incluidos en el Convenio de Estocolmo a fin de reducir su presencia a nivel mundial; ya que recientes investigaciones han demostrado su presencia, comportamiento ambiental y los efectos de estos al medio ambiente. La exposición humana a los RF provoca la alteración del equilibrio de las hormonas tiroideas, daños permanentes en el aprendizaje y la memoria, cambios de conducta, pérdida de audición, retraso en inicio de la pubertad, disminución del número de espermatozoides, malformaciones fetales y, posiblemente cáncer (Eljarrat & Barceló, 2011; Rahman, Langford, Scrimshaw, & Lester, 2001; UNEP, 2011).

3.1.1.6. *Convenio de Estocolmo*

El Convenio de Estocolmo tiene por objeto proteger la salud humana y el medio ambiente frente a los COP's, así como promover las mejores prácticas y tecnologías disponibles para reemplazar a los que se utilizan actualmente, y prevenir el desarrollo de nuevos COP's a través del fortalecimiento de las legislaciones nacionales y la instrumentación de planes nacionales de implementación para cumplir estos compromisos.

Establece un fuerte régimen internacional para promover la acción global respecto a los COP's que amenazan la salud y el desarrollo de los seres humanos y la vida silvestre, por lo que dispone una serie de medidas de control sobre su producción, importación, disposición, uso y eliminación. Desde su creación se han establecido las reglas de procedimiento y los órganos subsidiarios necesarios, como el Comité de Revisión de COP's, que garantizan su operación. Además de promover que los países parte integren sus Planes Nacionales de Implementación (PNI) para cumplir los compromisos que establece este instrumento

Dentro de las sustancias incluidas en el Convenio de Estocolmo (ver Tabla 2) se suman otras sustancias de reciente inclusión como: surfactantes, antiadherentes, retardadores de flama (como Penta-BDE, hexabromobifenilo (HBB) y Octa-BDE), Hexaclorobenceno (HCB) y parafinas cloradas de cadena corta, los cuales se pueden generar de manera no intencional, en procesos industriales químicos o térmicos (como la incineración de residuos), o en la quema de basura a cielo abierto, en incendios de vertederos de basura y de bosques, en la quema del rastrojo agrícola o bien en la combustión de leña intramuros para cocinar o calentarse. El Convenio establece además un mecanismo para la adición de nuevos COP y actualmente se encuentran en proceso de revisión diversas sustancias de uso industrial y plaguicidas como el Lindol y sus isómeros alfa y beta propuestos por México para su inclusión (SEMARNAT, 2007)

México firmó el convenio el 23 de mayo de 2001, en Suecia, y lo ratificó el 10 de febrero de 2003. Siendo el primer país de Latinoamérica en ratificar este convenio, el cual entró en vigor el 17 de mayo de 2004 lo cual llevó a la integración del PNI de composición

multisectorial en octubre 2007 al ser aprobado por el Comité Nacional de Coordinación de México. En este contexto, en nuestro país, el PNI cuenta con ocho planes de acción, a través de los cuales se busca dar seguimiento, reforzar y avanzar en la eliminación o reducción de la liberación de COP's al ambiente y de sus riesgos a la salud de la población y los ecosistemas acuáticos y terrestres (Tabla 3).

Tabla 3. Planes de acción que conforman el PNI de México para la implementación del Convenio de Estocolmo (SEMARNAT, 2007)

Plan de Acción	Objetivos
<i>Mejora del régimen jurídico y de la capacidad institucional para la gestión de COP's y otras sustancias tóxicas</i>	Que México cuente con un marco jurídico apropiado e instituciones fortalecidas para el cumplimiento efectivo, eficaz y eficiente a los dispuesto en el Convenio de Estocolmo
<i>Evaluación para la evaluación de los efectos de los COP en la salud y el ambiente, así como de sus implicaciones socioeconómicas.</i>	Que se prevengan o reduzcan los riesgos para la salud humana, a la biota acuática y terrestre, y al ambiente derivados de la contaminación por COP's y sus impactos socioeconómicos
<i>Eliminación de BPC.</i>	Que las existencias de BPC se eliminen de manera segura, ambientalmente adecuada, económicamente viable y verificable; y que los sitios contaminados con BPC sean inventariados, cuantificados y priorizados; para evitar o reducir los riesgos al ambiente y a la salud humana asociados con los BPC.
<i>Eliminación de la liberación al ambiente de plaguicidas que son COP's</i>	Que en México se eliminen las existencias de plaguicidas COP's, se evite que se generen plaguicidas caducados y se prevengan o reduzcan los riesgos al ambiente y la salud de los sitios contaminados con ellos.
<i>Reducción o eliminación de la liberación al ambiente de COPNI.</i>	Que en México se reduzcan las liberaciones totales no intencionales de COP's al ambiente de fuentes antropogénicas, con la meta de seguir reduciéndolas al mínimo y, en los casos en que sea viable técnica y económicamente, eliminarlas definitivamente
<i>Desarrollo de capacidades analíticas confiables sobre plaguicidas COP, BPC, HCB, dioxinas y furanos.</i>	Que el país cuente con capacidad analítica confiable para evaluar el impacto de las acciones que se desarrollen en el marco del PNI y ofrezca apoyo analítico a los países de la región de Centroamérica y el Caribe que lo requieran.
<i>Integración de inventarios de información sobre COP en un sistema unificado (Siscop).</i>	Que México cuente con un proceso de integración de inventarios de información y un sistema informático sobre COP's que facilite la ejecución del PNI y la evaluación de su eficacia.
<i>Comunicación, sensibilización y participación ciudadana.</i>	Que México cuente con una estrategia efectiva y continua de comunicación y capacitación mediante la cual se logre la participación ciudadana informada y organizada en la puesta en práctica del PNI.

3.1.1.7. *Retardadores de Flama*

Los retardadores de flama (RF), también llamados ignífugos, son compuestos o mezclas de compuestos que se incorporan principalmente en plásticos, textiles, madera, circuitos electrónicos y otros materiales para prevenir, reducir y demorar la inflamabilidad o propagación de las flamas a través de una superficie cuando se exponen a una fuente de ignición de baja energía como cigarrillos, fósforos, velas, etc. (Barón Gonzalez, 2015; Barrera Cordero, Castro Díaz, & Gavilan García, 2004; Guerra Gómez, 2011).

En consecuencia, los RF se encuentran distribuidos ampliamente en edificios públicos, centros comerciales y recreativos, aeropuertos, escuelas, etc. De manera análoga, están presentes en los hogares en productos como alfombras, ciertas telas para tapicería y cortinas, en recubrimientos, elementos de construcción y muebles de procedencia industrial, así como en una multitud de aparatos electrodomésticos (Janssen, 2005).

La producción mundial de estos compuestos en 2016 fue estimada en 2.6 millones de toneladas métricas con un incremento anual del 5.4% desde los últimos 30 años. Este aumento está relacionado con el aumento en el uso de materiales basados en polímeros y también por la estricta regulación contra incendios. En la figura 5 se muestra la producción mundial de RF (Vahabi, Sonnier, & Ferry, 2015).

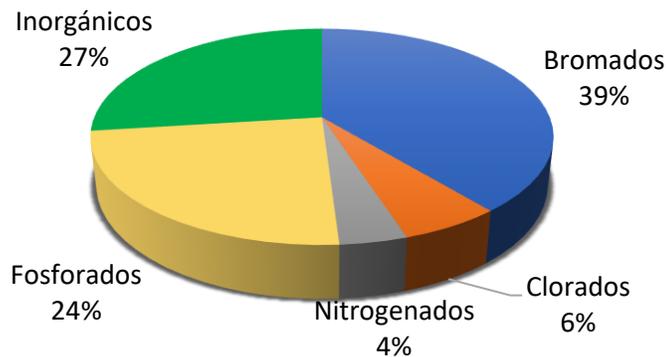


Figura 5. Producción mundial de retardadores de flama (De la Torre Haro, 2010; Vahabi et al., 2015).

En función de la manera en la que los retardantes de llama se incorporan a los distintos materiales, éstos se clasifican en: retardantes de carácter reactivo y retardantes de carácter aditivo. Los compuestos de carácter reactivo se incorporan al material mediante enlaces covalentes entre éstos y el material, mientras que los de carácter aditivo, se disuelven simplemente en el material (Alaee, Arias, Sjödin, & Bergman, 2003).

De acuerdo con su naturaleza, se puede clasificar a los RF en: fosforados, nitrogenados, inorgánicos y halogenados (RFH); estos últimos son los compuestos más utilizados a nivel mundial con el 45% de la producción total (De la Torre Haro, 2010). Los RFH siguen principalmente un mecanismo de interacción química con los radicales libres presentes en la fase gaseosa ya que, cuando se exponen a altas temperaturas los RFH liberan también radicales libres del halógeno (X^{\cdot}) del cual están compuestos, estos reaccionan con las moléculas de los gases combustibles resultado de la pirólisis del material, generando material halogenado HX. Los HX a su vez reaccionan con los radicales libres de alta energía (H^{\cdot} y OH^{\cdot}) produciendo agua y radicales X^{\cdot} , los cuales quedan disponibles para comenzar un nuevo ciclo de captura de H^{\cdot} y OH^{\cdot} , es por ello que la efectividad del RFH dependerá de la cantidad de átomos halógenos que contenga y la facilidad para liberarlos; este mecanismo se muestra en la figura 6 (Eljarrat & Barceló, 2011; Troitzsch, 1983).

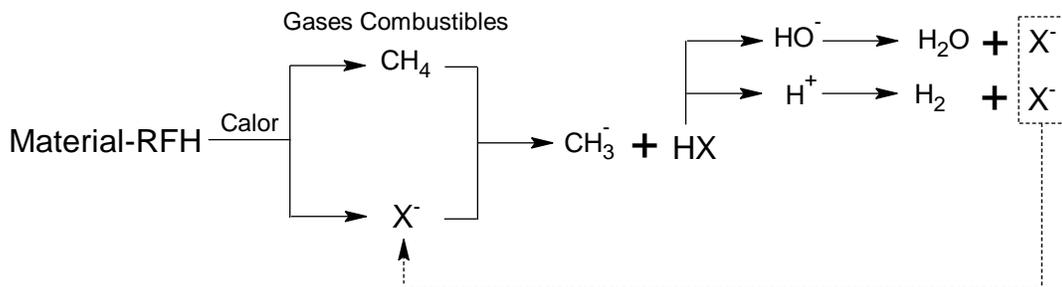


Figura 6. Mecanismo de acción química por captura de radicales de los RFH (Troitzsch, 1983).

Existen más de 75 tipos distintos de retardantes bromados (Eljarrat & Barceló, 2011) sin embargo los principales, en cuanto a volumen de producción y uso, destacan los siguientes: bifenilos polibromados (PBB), tetrabromobisfenol A (TBBPA), hexabromociclododecano (HBCD) y polibromodifenil éteres (PBDE). En la tabla 4 se muestran los principales usos de los retardadores de flama bromados.

Tabla 4. Usos de los principales RFB (Janssen, 2005).

Nombre Químico	Productos de aplicación
Éter de Pentabromodifenilo (Penta-BDE, PBDE o Penta)	Colchones, cojines, muebles tapizados y otros envases de espuma, relleno de alfombras, imitación de madera, pinturas, paneles de aislamiento de sonido, componentes electrónicos, recubrimientos de tela, resinas epoxi, cintas transportadoras.
Éter de Octabromodifenilo (Octa-BDE, OBDE u Octa)	Carcasas para máquinas de fax, computadoras, adornos de automóviles, teléfonos, carcasas de electrodomésticos, componentes electrónicos, equipos de audio y vídeo.
Éter de Decabromobifenilo (Deca-BDE, DBDE, o Deca)	Carcasas para televisores, computadoras, celulares, policarbonatos, resinas de poliéster, poliamidas, polipropilenos, tereftalatos, cloruro de polivinilo, pinturas, recubrimiento de cables, detectores de humo, conectores eléctricos, fusibles.
Tetrabromobisfenol A (TBBPA)	Resinas Epoxi y de policarbonato, placas de circuitos impresos en electrónica, carcasas de equipos de oficina, plásticos diversos, papel, textiles, televisores, revestimientos adhesivos en papel y textiles.
Hexabromociclododecano (HBCD)	Plásticos de poliestireno y polipropileno, textiles, televisores, carcasas de equipos de oficina, textiles en automóviles, materiales de construcción (paneles aislantes, bloques de construcción, aislamiento térmico, techos) espuma para tapizados, aglutinantes para látex.

La demanda mundial para esta familia de químicos en el año 2001 fue de 203,740 toneladas (CPRAC, 2010); si bien hay importantes diferencias regionales, como puede observarse en la Tabla 5, el TBBPA y Deca-BDE, suponían ya en el año 2001 el 87% de la demanda del mercado, mientras el HBCD representaba el 8%, y otras dos mezclas comerciales de PBDE contribuían con el 6%.

Tabla 5. Demanda total de RFB en toneladas métricas (CPRAC, 2010).

	Europa	América	Asia	Otros	Total
TBBPA	11,600	18,000	89,400	600	119,600 (59%)
Deca-BDE	7,600	24,500	23,000	1,050	56,150 (28%)
HBCD	9,500	2,800	3,900	500	16,700 (8%)
Penta- BDE	150	7,100	150	100	7,500 (4%)
Octa- BDE	610	1,500	1,500	180	3,790 (2%)
Total	29,460 (14.5%)	53,900 (26.5%)	117,950 (57.9 %)	2,430 (1.2%)	

3.1.1.8. *Tetrabromobisfenol A*

El Tetrabromobisfenol A (TBBPA) es un compuesto de estructura aromática en el que las cuatro posiciones libres del bisfenol se encuentran sustituidas por átomos de bromo. Es el retardante bromado más utilizado. Alrededor del 91 % de la producción de TBBPA se añade de forma reactiva, en las resinas epóxicas que contienen los circuitos

impresos, aunque también se puede usar de forma aditiva en polímeros como el acrilonitrilo butadieno estireno (Alaee et al., 2003), La Tabla 6 muestra las propiedades fisicoquímicas del TBBPA.

Tabla 6. Propiedades Fisicoquímicas del TBBPA (Abou-Elwafa Abdallah, 2016).

Propiedad	Valor
Fórmula Química	$C_{15}H_{12}Br_4O_2$
Estructura Química	
Numero CAS	79-94-7
Nombre IUPAC	2,6-Dibromo-4-[2-(3,5-dibromo-4-hidroxifenil)propan-2-il]fenol
Peso Molecular	543.9 g mol^{-1}
Punto de ebullición	$\sim 316 \text{ }^\circ\text{C}$
Punto de fusión	$181 - 182 \text{ }^\circ\text{C}$
Densidad	2.12 g cm^{-3}
Presión de Vapor	$6.24 \times 10^{-6} \text{ Pa a } 25 \text{ }^\circ\text{C}$
Solubilidad en Agua	<p>pH 5 - 0.148 mg L^{-1} a $25 \text{ }^\circ\text{C}$</p> <p>pH 7 - 1.26 mg L^{-1} a $25 \text{ }^\circ\text{C}$</p> <p>pH 9 - 2.34 mg L^{-1} a $25 \text{ }^\circ\text{C}$</p>
Log P	5.90

Diversos estudios han encontrado cantidades detectables de TBBPA en el aire cercano a los sitios de producción, en suelo y sedimentos (Malkoske et al., 2016). Se han llevado a cabo estudios sobre la tasa de biodegradación tanto en condiciones aerobias como anaerobias en distintos medios, con un resultado medio de 2 meses (CPRAC, 2010).

Dependiendo del tipo de suelo, temperatura, humedad, y la composición del suelo, aproximadamente 40-90% del TBBPA permanecía en el suelo tras 56-64 días (CPRAC, 2010; Fan et al., 2017). También está demostrada la sensibilidad a la luz de este compuesto, lo que resulta en una vida media por fotodegradación en agua que varía de 7 a 80 días, dependiendo de la estación del año (CPRAC, 2010; Feng, Lu, Gao, & Mao,

2017). La vida media del TBBPA en peces es inferior a 1 día, y en ostras, menor de 5 días (Abou-Elwafa Abdallah, 2016; Eljarrat & Barceló, 2011).

Algunas de las preocupaciones más recientes están basadas en su potencial como disruptor endocrino, dado que no existen estudios sobre las rutas de exposición y de incorporación de estos compuestos mediante la dieta: sin embargo, diversos estudios han encontrado trazas de esta sustancia en muestras de polvo de interiores y, si bien las fuentes de origen del polvo no se pudieron identificar, se puede asumir que provienen de alfombras tratadas, mobiliario, cableado, computadoras y otros aparatos electrónicos (Aznar-Alemany et al., 2018; Eljarrat & Barceló, 2011; Janssen, 2005). Debe resaltarse que estos estudios confirmaron la existencia de concentraciones de TBBPA en polvo de interiores 1 a 3 órdenes de magnitud (10 a 1000 veces), más bajos que los encontrados de otros RFB como PBDE (Eljarrat & Barceló, 2011; Janssen, 2005).

De acuerdo con Malkoske et. al. (2016) las principales fuentes de contaminación por TBBPA son aquellas relacionadas con la industria de síntesis y manufactura de productos con TBBPA, así como el reciclaje de residuos electrónicos y PTAR. Por su parte la Union Europea (2008), en su informe sobre riesgos del TBBPA reporta que las principales formas de exposición a este compuesto son vía cutánea, inhalación e ingestión, siendo afectados principalmente organismos acuáticos y seres humanos. Las fuentes, distribución ambiental y vías de exposición del TBPPA se representan en la Figura 7.

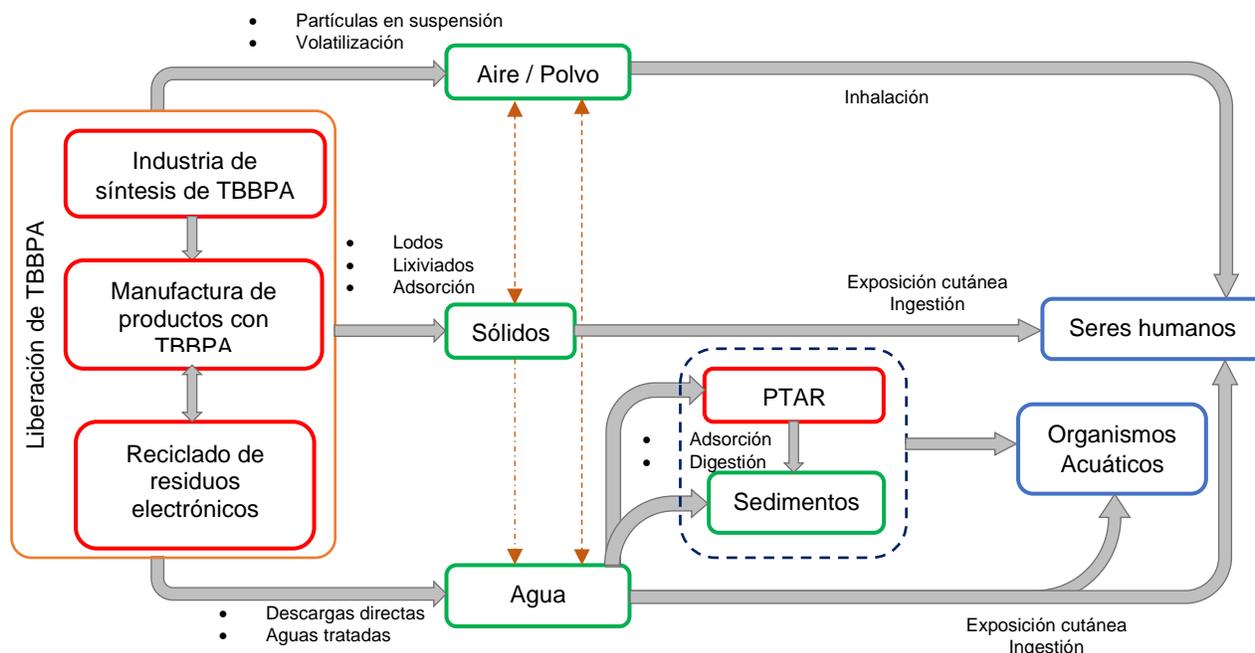


Figura 7. Fuentes (rojo), distribución ambiental (verde) y vías de exposición del TBPPA. (Adaptado de Malkoske et al., 2016).

3.1.1.9. Biocatálisis Ambiental

El término Biocatálisis se refiere a la utilización de células o sus enzimas aisladas para catalizar reacciones o transformaciones que conducen a la obtención de compuestos de interés, que satisfacen numerosas necesidades humanas. La utilización de células o enzimas ha demostrado su eficacia en la producción de biocombustibles alternativos al petróleo, o en la industria textil y de detergentes, así como en la síntesis y degradación de fármacos, herbicidas, insecticidas y otros productos químicos. Algunas de las aplicaciones de tratamientos a efluentes industriales se muestran en la tabla 7.

Tabla 7. Biocatálisis Ambiental en el tratamiento de efluentes industriales (Elaboración propia, 2017)

Enzima	Procedencia	Aplicaciones
Peroxidasa	Rábano picante	Degradación de fenoles, clorofenoles, anilinas, biosensor en la determinación de fenol
	<i>Artromyces ramosus</i> Plantas	Degradación de fenoles, poliaromáticos y herbicidas. Descontaminación de aguas
Cloroperoxidasa	<i>Caldariomyces fumago</i>	Oxidación de compuestos fenólicos. Biosensor en la detección de clorofenol
Lignina peroxidasa	<i>Phanerochaete chrysosporium</i>	Degradación de compuestos aromáticos y materiales fenólicos. Remediación del efluente Kraft
	<i>Chrysonilia sitophila</i>	Descontaminación de efluente Kraft

Manganeso peroxidasa	<i>Phanerochaete chrysosporium</i>	Degradación de fenoles, lignina y pentaclorofenol
	<i>Nematolona frowardi e Phebia radiata</i>	Degradación de la lignina
	<i>Lentinula edodes</i>	Degradación de clorofenol
	<i>Trametes hispida</i>	Decolorización de efluentes
	<i>Pyricularia oryzae</i>	Degradación de colorantes Azo
Lacasa	<i>Trametes versicolor</i>	Degradación de efluentes textiles, clorofenoles y derivados de la urea
	<i>Cerrena unicolor</i>	Degradación de fenoles y 2,4- diclorofenol
	<i>Pycnoporus cinnabarinus</i>	Degradación de benzopirenos
Catecol dioxigenasa	<i>Comamonas testosteroni</i>	Oxidación de clorofenoles
	<i>Pseudomonas pseudoalcaligenes</i>	Bifenilos policlorados.

3.1.1.10. Nanofibras biocatalíticas

Entre las múltiples metodologías dirigidas a superar una de las principales limitaciones del uso de las enzimas en procesos industriales, principalmente la estabilidad del biocatalizador; se encuentra la inmovilización de enzimas en soportes sólidos. En este sentido, los nanoarreglos de enzimas inmovilizadas en la superficie de nanomateriales constituyen un grupo de biocatalizadores inmovilizados de última generación, con propiedades biocatalíticas superiores a las de los derivados inmovilizados convencionalmente (Caracciolo, Tornello, Buffa, Ballarin, & Cuadrado, 2011).

Los recientes progresos en nanomateriales abren la posibilidad de mejoramiento a la biocatálisis, ya que muchos materiales nanoestructurados, como los soportes mesoporosos, las nanopartículas, las nanofibras y los nanotubos, han demostrado su eficiencia en la inmovilización de enzimas (del Monte-Martínez et al., 2013; Díaz Ramos, 2012; Tighzert, Habi, Aji, Sadoun, & Daoud, 2017; Wong et al., 2014). Estos materiales presentan una alta estabilidad, facilidades cinéticas para la reacción y un área superficial elevada, lo que posibilita el aumento de la carga de enzimática en el nanomaterial (del Monte-Martínez et al., 2013). En los últimos quince años se ha explorado una técnica novedosa para generarlas, denominada electrohilado y a la que se conoce más por su nombre en inglés, electrospinning (Caracciolo et al., 2011; Wong et al., 2014).

La producción de materiales nanofibrosos mediante electrohilado presenta importantes ventajas frente a métodos convencionales para obtener fibras como el hilado en seco, en húmedo, en fundido o sol-gel. Estas son:

- a. Producción de micro/nanofibras continuas que generan una matriz tridimensional altamente porosa.
- b. Pueden obtenerse diferentes materiales (polímeros naturales o sintéticos, biodegradables o bioestables, híbridos, cerámicos o compuestos) en diversas geometrías.
- c. La producción de fibras resulta en diámetros nanométricos, no alcanzados por las técnicas tradicionales.
- d. Las membranas obtenidas poseen un área específica muy alta, gran flexibilidad.
- e. Las fibras obtenidas presentan la capacidad para incorporar agentes activos, aditivos y biológicos.

Actualmente la inmovilización de enzimas en Nanofibras se ha reportado para la degradación de COP's. La tabla 8 resume algunas de los tratamientos por Nanofibras biocatalíticas en la remoción de contaminantes.

Tabla 8. Uso de Nanofibras biocatalíticas en la remoción de contaminantes (Elaboración propia, 2017).

Soporte	Enzima	Contaminante	Referencia
Quitosano/ Alcohol Polivinílico	Lacasa	2,4-diclorofenol Remoción: 87.6% en 6 horas	(Xu, Zhou, Li, & Zhang, 2013)
Polietileno/ Polipropileno	Lacasa	Fenantreno (95.1%) Fluorantreno (93.2%) Antraceno (79.1%) Pireno (72.5%) Remoción: 1.5 horas	(Dai, Yin, & Niu, 2011)
Acetato de vinilo/ SiO ₂	Lacasa	Triclosan Remoción: 65.5% en 2 horas	(Xu, Si, Wu, Li, & Zhang, 2014)
Quitosano/ Alcohol Polivinílico/ Nitrocelulosa	Peroxidasa de Rabano Picante	TBBPA Remoción: 95.9 % en 3 horas	(Xu et al., 2015)
Celulosa	Lacasa	Colorantes de la industria textil Remoción: 88% en 3 horas	(Sathishkumar et al., 2014)
Quitosano	Manganeso Peroxidasa	Colorantes de la industria textil Remoción: 97.31%	(Bilal, Asgher, Iqbal, & Hu, 2016)
Poliamida 6/ Quitosano	Lacasa	Bisfenol A (90%) Etil Etil Estradiol (57%) Remoción: 1 hora	(Mary, Rotková, & Sevc, 2016)

Como se puede observar en la tabla 8, la naturaleza del soporte en las nanofibras biocatalíticas puede ser de origen natural o sintético y se pueden aplicar ampliamente en la remoción de contaminantes de diferente naturaleza, obteniendo porcentajes altos de remoción en tiempos cortos de reacción.

En esta investigación se utilizará Quitosano (QS) como soporte el cual es un copolímero, formado por unidades de glucosamina y N-acetil glucosamina, unidas por enlaces glucosídicos β (1-4). El quitosano se obtiene de la desacetilación de la quitina, el cual es el segundo polisacárido más abundante en la naturaleza sólo después de la celulosa. En la naturaleza este biopolímero forma parte de la pared celular de hongos y exoesqueletos de crustáceos, moluscos e insectos, siendo el primero su fuente principal (Kim *et al.*, 2008; Pillai *et al.*, 2009; Rodríguez *et al.*, 2009).

El grado de desacetilación (DD) de este biopolímero depende de la cantidad de glucosamina presente en él y que, dependiendo del proceso y condiciones de obtención, se logran pesos moleculares en un rango de 300 a 1000 kDa con DD de 50% al 95%. En su forma cristalina, el quitosano es normalmente insoluble en soluciones acuosas alrededor de pH 7, sin embargo, en ácidos diluidos (pH<6.0), se protonan los grupos aminos libres de la unidad glucosamina, facilitando la solubilización de la molécula (Kim *et al.*, 2008; Pillai *et al.*, 2009) y, creado un comportamiento de policación, el cual le permite enlazarse con sustancias cargadas negativamente tales como lípidos, proteínas, colorantes, entre otras (Rodríguez, 2003; Chao *et al.*, 2004).

Generalmente, el quitosano contiene tres tipos de grupos funcionales reactivos: un grupo amino o acetamido, un grupo hidroxilo primario y otro secundario en las posiciones C2, C3 y C6 respectivamente. Estos grupos funcionales altamente reactivos permiten la modificación del quitosano al insertar en ellos moléculas de diferente naturaleza química para aplicaciones específicas. La estructura de la quitina y el quitosano, así como la posición de sus grupos funcionales reactivos se ilustran en la Figura 8.

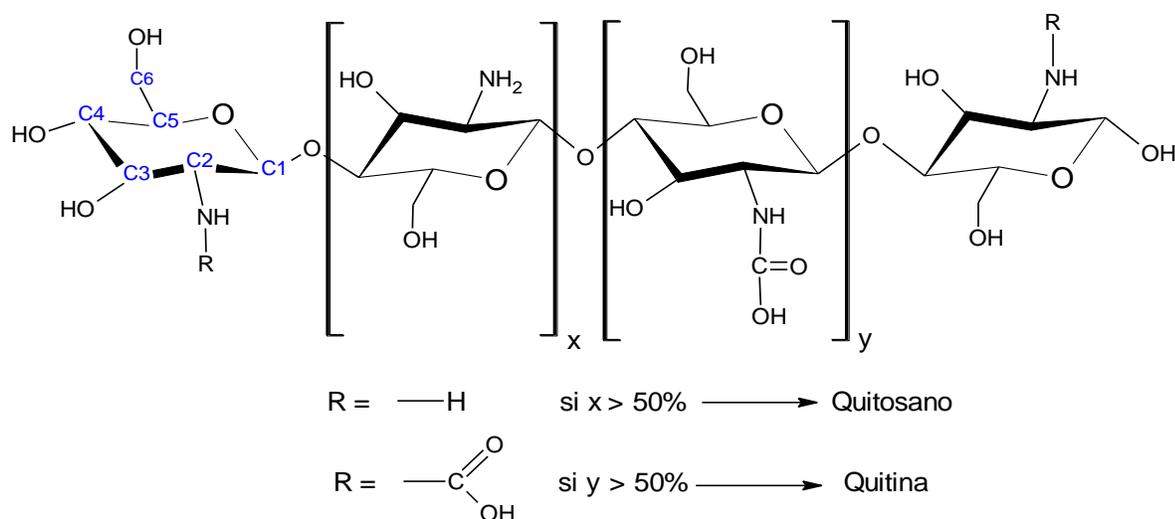


Figura 8. Estructura de la quitina y el quitosano (Elaboración propia, 2018).

Es esta naturaleza química del quitosano la que ofrece muchas posibilidades para realizar modificaciones iónicas y covalentes, las cuales le permiten poseer una amplia gama de propiedades mecánicas, químicas y biológicas (Kim *et al.*, 2008), estas incluyen la biocompatibilidad, biodegradabilidad, toxicidad nula, actividad antifúngica, antibacterial y antioxidante, inhibición o retardo en el crecimiento de bacterias Gram-positivas y Gram-negativas, así como un efecto reductor del colesterol, floculante, adherente y adsorbente, (Sarkar-Majumdar, 2011; Benhabiles *et al.*, 2012) por mencionar algunas. En este contexto, el quitosano tiene potencial en el área biotecnológica como soporte para inmovilización de enzimas, biosensores y biopolímeros. (Kasaai, 2009; Pacheco *et al.*, 2009; Expósito, 2010; Rani *et al.*, 2010; Zamora *et al.*, 2010; Cabrera, 2011).

Adicionalmente se utilizará alcohol polivinílico (PVA), el cual es un polímero sintético biocompatible e hidrofílico, producto de la alcoholización del acetato de polivinilo y cuyas propiedades fisicoquímicas dependen del grado de polimerización e hidrólisis del mismo (Figueiredo, Alves, & Borges, 2009). Sin embargo, su aplicación se ve limitada debido a su elevada afinidad al agua, la cual puede ser modificada por reticulación causada por adición de glutaraldehído (Abd El-aziz, El-Maghraby, & Taha, 2017). En la Figura 9 se muestra la estructura del PVA.

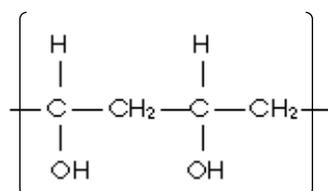


Figura 9. Estructura del alcohol polivinílico (Elaboración propia, 2018).

La estabilidad química del PVA a temperatura ambiente, así como sus propiedades fisicoquímicas, permiten su uso en diferentes aplicaciones prácticas, y que en años recientes se han centrado en la formación de hidrogeles en aplicaciones biomédicas, en la producción de emulsificantes y adhesivos en la industria papelera y textil (Abd El-aziz et al., 2017), así como en la elaboración de membranas para la liberación controlada de medicamentos y la inmovilización de células y enzimas, logrando mejorar sus estabilidad térmica, química y mecánica (Figueiredo et al., 2009).

Estudios realizados por Zain, Suhaimi, & Idris, (2011) sobre mezclas de PVA/alginato y PVA/ácido algínico mostraron buena estabilidad mecánica y química, mezclas de PVA/almidón se han usado como membranas de diálisis y las de PVA/dextrano y PVA/QS pueden ser aplicación en sistemas de liberación controlada de fármacos y compuestos activos (M. G. Cascone et al., 2001).

De acuerdo con Lee et al. (2012), las mezclas de polímeros se han probado con éxito en la coagulación y floculación de tratamiento de aguas residuales. Majidnia & Idris, (2015), utilizaron perlas de PVA/alginato para la remoción de Cesio en aguas residuales radioactivas, los resultados mostraron un rendimiento de eliminación del 71% de cesio. Por su parte, Abd El-aziz et al., (2017), estudiaron la remoción iones de Zn^{2+} en aguas residuales tratadas usando nanofibras de PVA e Hidroxiapatita, los resultados mostraron un rendimiento en la eliminación del 100% de estos iones. Es con estos antecedentes que resaltan la factibilidad técnica y científica de las mezclas de biopolímeros que en este proyecto se estudiará la mezcla de QS y PVA para la remoción del TBBPA.

3.2. Marco Conceptual

3.2.1. Tipo de investigación

Para fines de este trabajo de investigación se hará uso de las investigaciones de tipo exploratoria y correlacional. Debido a que la revisión bibliográfica nos refiere a literatura con ciertas vertientes que aún no han sido estudiadas completamente. Si bien existen reportes de la degradación de COP's, las investigaciones sobre la degradación de RF mediante métodos biocatalíticas es limitada. Es por lo que, la presente investigación se iniciaría como exploratoria dando paso a una investigación correlacional debido a que se estudiará el grado de relación entre las variables en la degradación del TBBPA con el fin de optimizar mediante un diseño factorial las condiciones de mayor degradación del compuesto (Hernandez Sampieri, 2014).

3.2.2. Paradigma

El paradigma en una investigación suele definirse especificando su ontología, su epistemología y su metodología. Un paradigma es el conjunto de conceptos, valores, hipótesis y procedimientos que conforman una unidad a una disciplina científica, o bien, el conjunto de creencias o visiones del mundo alrededor de las cuales se organiza la realidad (Moreno, et al., 2001).

Es por lo anteriormente expuesto que, para la presente investigación se empleará un paradigma del tipo constructivista ya que el conocimiento se generará en la reproducción de este; por otra parte, se hará uso de una ontología relativista pues al tratarse de experimentación, las condiciones serán establecidas y, en consecuencia, la veracidad quedará sujeta a su validez subjetiva y relativa a las diferentes fases de aplicación (fase de laboratorio y fase de campo). Por ello mismo la epistemología es subjetivista dado que los resultados serán obtenidos a partir del proceso de interacción entre el investigador y lo investigado.

3.2.3. Enfoque Epistemológico

Para la sistematización de los enfoques epistemológicos se utilizan dos variables: una es de tipo gnoseológico, referente a las evidencias acerca de la fuente del

conocimiento (empirismo / racionalismo). La otra es de tipo ontológico, que tiene que ver con las relaciones del sujeto con la realidad (idealismo / realismo). De esta manera, la conjunción resulta en: el enfoque empirista-realista, el enfoque empirista-idealista, el enfoque racionalista-realista y el enfoque racionalista-idealista (Padron, 2007).

Así, el presente trabajo estará sujeto al enfoque Racionalista/Realista al basarse en deducciones controladas, abstracciones y sistemas lógico-matemáticos. (Padron, 2007).

3.2.4. Teorías que soportan la investigación

La teoría de sistemas constituye una propuesta para abordar el estudio de sistemas complejos. Se trata en primera instancia de una metodología de trabajo interdisciplinario, pero al mismo tiempo un marco conceptual que fundamenta sobre bases epistemológicas el trabajo multidisciplinario (García, 2006).

En esta investigación, en particular, cabe destacar que el estudio es interdisciplinario debido a las interacciones del sistema que generan múltiples variables que no pueden explicarse a partir de las propiedades de un solo componente, como el impacto ambiental de los RF en un ecosistema, efectos a la salud, el desarrollo tecnológico y sus interrelaciones, convirtiéndolo en un sistema complejo.

3.3. Marco Legal

3.3.1. Normatividad, leyes y reglamentos

La investigación está fundamentada con la siguiente normativa relativa a la calidad del agua:

- Norma Oficial Mexicana NOM-001-SEMARNAT-1996, Límites Máximos Permisibles de Contaminantes en las descargas de Aguas Residuales en Aguas y Bienes Nacionales, la cual establece los límites máximos permisibles de contaminantes en las descargas de aguas residuales vertidas a aguas y bienes nacionales, con el objeto de proteger su calidad y posibilitar sus usos, y es de observancia obligatoria para los responsables de dichas descargas.

- Ley General del Equilibrio Ecológico y la Protección al Ambiente la cual se refieren a la preservación y restauración del equilibrio ecológico, así como a la protección al ambiente, en el territorio nacional y las zonas sobre las que la nación ejerce su soberanía y jurisdicción. Sus disposiciones son de orden público e interés social y tienen por objeto establecer las bases para:
 - i. Definir los principios de la política ecológica general y regular los instrumentos para su aplicación;
 - ii. El ordenamiento ecológico;
 - iii. La preservación, la restauración y el mejoramiento del ambiente;
 - iv. La protección de las áreas naturales y la flora y fauna silvestres y acuáticas;
 - v. El aprovechamiento racional de los elementos naturales de manera que sea compatible la obtención de beneficios económicos con el equilibrio de los ecosistemas;
 - vi. La prevención y el control de la contaminación del aire, agua y suelo;
 - vii. La concurrencia del gobierno federal, de las entidades federativas y de los municipios.
 - viii. La coordinación entre las diversas dependencias y entidades de la Administración Pública Federal, así como la participación corresponsable de la sociedad, en las materias de este ordenamiento.

IV. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

4.1. Preguntas de Investigación

¿Cuál es la eficiencia de la transformación biocatalítica de los retardadores de flama a compuestos inocuos usando a la Enzima Cloroperoxidasa en efluentes de la PTAR de Izúcar de Matamoros?

V. HIPÓTESIS

5.1. Hipótesis General

La enzima Cloroperoxidasa es capaz de degradar los retardadores de flama transformándolos a compuestos de menor impacto ambiental

VI. OBJETIVOS

6.1. Objetivo General

Evaluar la factibilidad de la degradación de los retardadores de flama a compuestos de menor impacto ambiental utilizando la enzima Cloroperoxidasa en agua residual tratada de la Planta de tratamiento de aguas residuales Izúcar de Matamoros.

6.2. Objetivos Específicos

- 1) Determinar los parámetros cinéticos en la degradación de los retardantes de flama mediante el uso de la enzima Cloroperoxidasa en muestras modelo.
- 2) Producir y caracterizar nanofibras de quitosano/alcohol polivinílico acopladas con Cloroperoxidasa.
- 3) Identificar la capacidad de degradación del sistema Nanofibras-Cloroperoxidasa.
- 4) Determinar la biodegradabilidad y toxicidad de los retardadores de flama antes y después del tratamiento biocatalítico.
- 5) Aplicar el tratamiento de degradación en efluentes de una planta de tratamiento de aguas residuales del estado de Puebla.

VII. DISEÑO DE LA INVESTIGACIÓN

7.1. Localización

La investigación se realizó en el laboratorio de Bioinorgánica Aplicada del Centro de Química perteneciente al Instituto de Ciencias (ICUAP), así como en el Laboratorio de Alimentos de la Facultad de Ingeniería Química, ambos pertenecientes a la Benemérita Universidad Autónoma de Puebla.

Los muestreos se realizaron en la Planta de Tratamiento Aguas Residuales Izúcar de Matamoros, situada en el ejido de San Nicolas Tolentino perteneciente al municipio de Izúcar de Matamoros, Puebla., cuyo cuerpo receptor es el Rio Nexapa.

7.2. Fase de Campo

7.2.1. Muestreo de Campo

Se recolectaron muestras agua de los efluentes de la planta de tratamiento de aguas residuales de Izúcar de Matamoros en la temporada de lluvias y sequía, esto de acuerdo con Norma Mexicana NMX-AA-003-1980 para el muestreo de aguas residuales. La muestra fue preservada durante el transporte en un baño de hielo y posteriormente almacenada a 4°C hasta su caracterización fisicoquímica.

7.3. Fase de Laboratorio

Esta investigación se divide en cuatro etapas: 1) Determinación de constantes cinéticas y optimización de las condiciones de reacción del sistema sin inmovilizar, 2) producción de nanofibras y caracterización del sistema nanofibras-CPO 3) determinación de la biodegradabilidad y toxicidad de los productos de reacción. y 4) aplicación de la propuesta biotecnológica desarrollada, en efluentes de una planta de tratamiento de agua residuales. La figura 10 muestra la estrategia experimental desarrollada en esta investigación

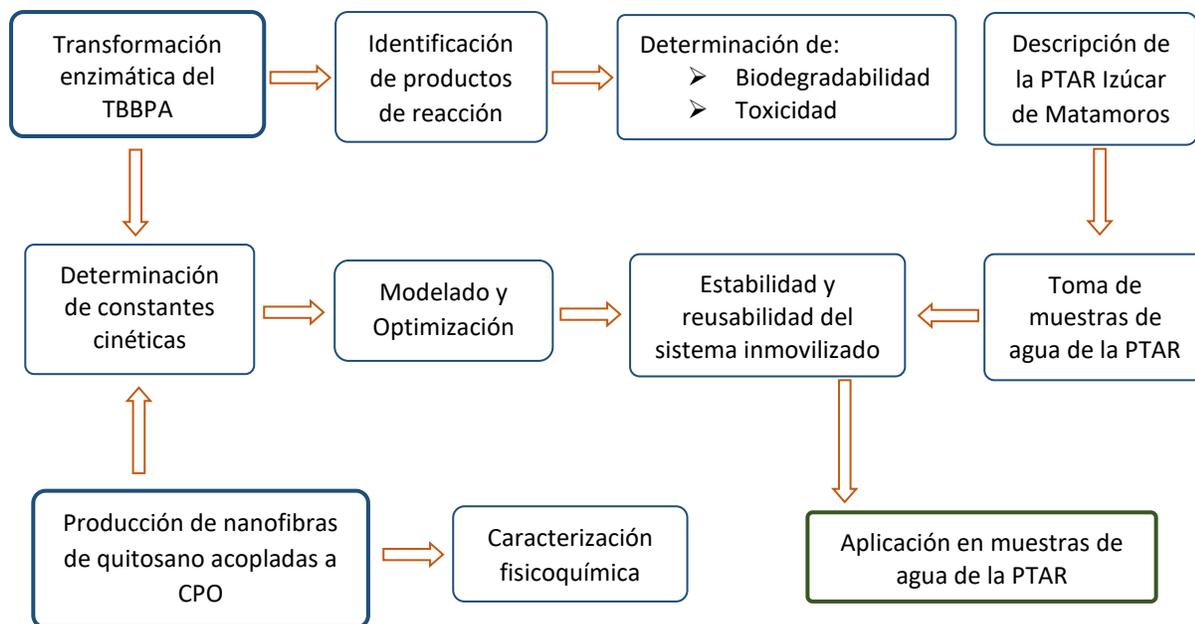


Figura 10. Estrategia experimental (Elaboración propia, 2018).

7.3.1. Diseño Experimental

7.3.1.1. Oxidación enzimática del TBBPA

La oxidación enzimática se realizó en un volumen de 1 mL, el cual contenía una concentración 5 μM TBBPA, 0.1 mM de H_2O_2 y 200 mM KCl en amortiguador de fosfatos 60 mM pH 3.0, a este medio se adicionó 10 nM de la enzima Cloroperoxidasa de *Caldariomyces fumago*.

La reacción fue realizada por triplicado y monitoreada durante 30 minutos por el cambio de área a 207 nm mediante un cromatógrafo de líquidos de alta resolución HPLC marca Perkin Elmer Serie 200, equipado con detector UV-Vis modelo 785^a, sistema de interfase Network Chromatography NC1900 y una columna C18 de 25 cm de longitud, 4.6 mm de diámetro interno y tamaño de partícula de 5 μm marca Phenomenex. Las condiciones de operación fueron establecidas en flujo isocrático de 1 mL/min usando ACN/Ácido fosfórico 20mM pH 2.0 en relación 3:1 como fase móvil.

7.3.1.2. *Conversión del TBBPA*

La conversión del TBBPA se realizó de manera similar al punto anterior para cada uno de los ensayos del diseño experimental, así como después del tratamiento con el sistema nanofibras-CPO y en la aplicación de muestras de agua residual de la PTAR de Izúcar de Matamoros. El porcentaje de conversión se determinó con la ecuación 1.

$$\% C = \frac{X_i - X_f}{X_i} \times 100 \quad \text{Ecuación 1}$$

Donde:

X_i = Concentración inicial.

X_f = Concentración final.

7.3.1.3. *Determinación de constantes cinéticas*

La determinación de las constantes cinéticas se realizó de manera similar al apartado anterior, los cambios de área se monitorearon cada minuto por 15 minutos. Los datos obtenidos se ajustaron de forma no lineal al modelo de Michaelis-Menten, con ayuda del software OriginPro 8.0.0 para obtener las constantes cinéticas. Este proceso se realizó con la enzima inmovilizada y sin inmovilizar para su posterior comparación.

7.3.1.4. *Extracción e identificación de productos de reacción*

La extracción de los productos se llevó a cabo después del proceso de oxidación enzimática, esta reacción fue escalada a un volumen de 100 mL, utilizando las mismas condiciones del apartado 7.3.1.1. Al término de la reacción, esta fue concentrada 100 veces mediante extracción en fase sólida utilizando un cartucho SPE Lichrolut[®] RP-18 de 200 mg y tamaño de partícula de 40-63 μm previamente acondicionado con 10 mL de metanol seguido de 6 mL de agua y flujo de 2 mL/min. El lavado de cada cartucho se realizó con 10 mL de agua seguidos de 10 mL de una solución metanol-agua 20/80 v/v y secados al vacío durante 5 min. Los productos de reacción fueron eluidos por gravedad con 5 mL de metanol, secados en corriente suave de nitrógeno y reconstituidos en 1 mL de metanol para su posterior identificación.

La identificación de productos de reacción del apartado anterior se realizó en el laboratorio de absorción y cromatografía perteneciente al Instituto de Ciencias ICUAP de la Benemérita Universidad Autónoma de Puebla. Los parámetros de análisis cromatográfico y de detección se muestran en la tabla 9.

Tabla 9. Parámetros de análisis y detección de TBPPA y productos de reacción.

Parámetros de análisis cromatográfico	
Columna	Zorbax SB C18-Selecc 5 µm, 4.6x100 mm
Fase móvil	A: H ₂ O + 0.1% ácido fórmico B: MeOH + 0.1% ácido fórmico
Flujo	0.7 mL/min
Método	Gradiente: 50 – 90% B 30 min, 90% B 5 min, 50% B 35 – 55 min.
Vol. de inyección	100 µL
Parámetros de detección	
Voltaje del capilar	3500 V
Voltaje del fragmentador	175 V
Voltaje de Skimer	65 V
Temperatura de gas de secado	350 °C
Flujo de gas de secado	11 L/min
Presión de nebulizador	60 psi
Polaridad	Negativa

7.3.1.5. *Determinación de la Biodegradabilidad*

La determinación de la biodegradabilidad se establecerá de forma indirecta al cuantificar la Demanda Biológica de Oxígeno (DBO) para el TBBPA y los productos de reacción del tratamiento biocatalítico. Estas pruebas se realizarán de acuerdo con la norma OCDE 301-D, la cual mide la evolución de Oxígeno Disuelto (OD) de cada muestra problema durante 28 días en botellas tipo Winkler.

El OD se determinó mediante el método Winkler de modificación de azida, para lo cual se utilizó un kit de reactivos HANNA Instruments siguiendo la metodología proporcionada por el fabricante; la cuantificación se realizó a 420 nm en un fotómetro modelo HI-83099 de la misma marca, mediante el método 32 correspondiente a la cuantificación de oxígeno disuelto entre 0 y 10 mg O₂/L.

Los valores de OD convertidos a DBO y porcentaje de degradación de acuerdo con la misma norma mediante el uso de las ecuaciones 2, 3 y 4 presentadas a continuación.

$$DBO_i = \frac{OD_{iSP} - OD_{iB}}{M_{SP}} \quad \text{Ecuación 2}$$

$$\% \text{ Degradación} = \frac{DBO_i}{DThO} \times 100 \quad \text{Ecuación 3}$$

$$DTh = \frac{16 \left[2c + \frac{1}{2}(h - cl - 3n) + 3s + \frac{5}{2}p + \frac{1}{2}na - o \right]}{MW} \quad \text{Ecuación 4}$$

Donde:

DBO_i = Demanda biológica de oxígeno al día *i* en mg O₂/mg de sustancia de prueba.

OD_{iSP} = Oxígeno consumido por la sustancia de prueba al día *i* en mg O₂/L.

OD_{iB} = Oxígeno consumido por el medio mineral al día *i* en mg O₂/L.

M_{SP} = Sustancia de prueba en la botella Winkler en mg/L.

MW = Peso molecular de la sustancia de prueba.

DThO = Demanda teórica de oxígeno.

c, h, cl, n, na o, p y s = Número de átomos de cada especie atómica en la molécula de la sustancia de prueba con forma C_cH_hCl_{cl}N_nNa_{na}O_oP_pS_s.

7.3.1.6. Pruebas de Toxicidad.

Para la determinación de la dosis letal 50 (LD50) se utilizó *Artemia salina* como organismo modelo. Se emplearon quistes deshidratados comerciales obtenidos de Biogrow ® (225,000 nauplios por gramo); estos fueron hidratados en agua de mar Instant Ocean ® (29.9 g/L) a 28 °C en una celda de incubación dotada con un sistema de aireación por burbujeo y expuestos a iluminación constante. Los nauplios recién eclosionados (Instar I) fueron separados de los no eclosionados y cascarones, mediante fototropismo positivo.

El ensayo de toxicidad aguda 24 y 48 horas se llevó a cabo al evaluar la mortalidad de los nauplios de *Artemia salina* de 24 horas de vida (Instar II y III). El ensayo consistió en la exposición de 7 - 12 organismos por grupo a concentraciones crecientes de TBBPA

(1 – 40 µg/L), productos de reacción, además de un grupo control (expuesto a agua de mar) y un grupo control de peróxido de hidrógeno con una concentración idéntica a la presente en la reacción (0.1 mM). Las diluciones se realizaron en agua salina (29.9 g/L) hasta un volumen de prueba de 250 µL por ensayo. Los nauplios fueron expuestos durante 24 y 48 h a temperatura de 21 °C y 28 °C en total oscuridad; todos los experimentos se realizaron por triplicado con 4 repeticiones por prueba. Durante el tiempo de exposición no se suministró alimento a los organismos.

Transcurrido el tiempo de exposición, se contaron los individuos muertos para el cálculo de la LC₅₀ mediante el método probit; se consideraron muertos aquellos individuos que no presentaron movimiento durante 10 segundos (Libralato, Prato, Migliore, Cicero, & Manfra, 2016).

7.3.1.7. *Nanofibras de quitosano/alcohol polivinílico*

Las nanofibras de quitosano/alcohol polivinílico (NFsQ) se electrohilaron a partir de una solución 3% w/v de quitosano/ácido acético 1M y una solución 10% w/v de alcohol polivinílico en relación 1:1. Los parámetros de electrohilado fueron fijados a 28 kV, 20 cm de distancia de colección, velocidad de flujo 0.2 mL h⁻¹ y colección de 100 rpm.

7.3.1.8. *Caracterización fisicoquímica de las Nanofibras*

7.3.1.8.1. *Microscopia Electrónica de Barrido*

Se tomó 1 cm² de cada una de las nanofibras electrohiladas y fueron sometidas a un baño de oro al alto vacío durante 1 minuto con ayuda de una unidad de devastado y bombardeo de iones marca Denton Vacuum modelo Desk V.

Las micrografías fueron obtenidas a 500X, 1 000X, 3 000X, 5000X y 10 000X con un voltaje de aceleración de 25 kV en un microscopio electrónico de barrido marca JEOL modelo JSM-6610 equipado con el software Smile View™. La determinación del diámetro de las nanofibras se realizó con el software de procesamiento de imágenes ImageJ v1.51j8.

7.3.1.8.2. Espectroscopia de Infrarrojo

Los espectros de infrarrojo de las nanofibras electrohiladas se obtuvieron con un espectrofotómetro IR con transformada de Fourier (FT-IR) marca Perkin Elmer, modelo Spectrum 100 equipado con ATR. Los espectros de infrarrojo se colectaron con el software Spectrum™ 10 incluido en el equipo, en un intervalo de número de onda entre 600 y 4000 cm^{-1} .

7.3.1.8.3. Calorimetría de Barrido Diferencial

El análisis térmico de las nanofibras se llevó a cabo en un calorímetro diferencial de barrido (DSC) marca TA Instruments modelo 2010 equipado con un flujómetro de la misma marca y calibrado con indio ($T_m = 429.75 \text{ K}$). En una de las dos celdas de aluminio se agregó aproximadamente 2 mg de las fibras, mientras que la otra celda se colocó vacía para poder medir las diferencias de flujo de calor entre ambas. El análisis se realizó en atmósfera de nitrógeno con un flujo de 70 mL/min, mientras que la rampa de calentamiento fue establecida en 10 $^{\circ}\text{C}/\text{min}$ en un intervalo de 25 a 600 $^{\circ}\text{C}$. Las temperaturas de transición vítrea (T_g) y de fusión $^{\text{TM}}$, así como las entalpías de fusión fueron calculadas haciendo uso del software Universal Analysis 2000 v 4.5a.

7.3.1.9. Inmovilización enzimática en NFsQ

El proceso de inmovilización de CPO sobre nanofibras se realizó posterior a la modificación del material con la finalidad de activar la superficie y evitar la solubilidad del soporte; la reticulación consistió en la exposición del material a vapores de glutaraldehído al 25% durante 48 h a temperatura ambiente.

Posteriormente, se usó en cada prueba de inmovilización 1 cm^2 de fibra activada; el proceso de inmovilización consistió en poner en contacto las NFsQ con la dosis deseada de enzima (2.3 μM) en 1 mL de amortiguador fosfatos 60 mM pH 3.0 durante 24 horas a 4 $^{\circ}\text{C}$ en agitación suave. Transcurrido el tiempo de incubación, las nanofibras con actividad biocatalítica (NFsQ-CPO) fueron lavadas con la misma cantidad de amortiguador hasta que este no presentara actividad enzimática.

La cantidad de biocatalizador inmovilizada fue determinada directamente al cuantificar la actividad enzimática estándar utilizando Acetato de Tionina como sustrato, esta prueba se realizó en volumen de 1 mL, el cual contenía una concentración de 0.10 μM de acetato de tionina, 0.5 mM de H_2O_2 y 200 mM KCl en amortiguador de fosfatos 60 mM pH 3.0, a este medio se adicionó 0.25 cm^2 de NFsQ-CPO y se monitorear los cambios de absorbancia debidos a la oxidación enzimática a 598 nm. La pendiente del cambio de absorbancia por minuto se consideró como la velocidad de reacción y se utilizó para calcular la actividad enzimática estándar.

7.3.1.10. *Cuantificación de adsorción por NFsQ-CPO*

Esta prueba consistió en colocar 1 cm^2 de NFsQ-CPO en una solución de TBBPA 10 μM en agitación constante. La cuantificación de la adsorción se determinó por HPLC al monitorear los cambios de área del TBPPA durante 30 min.

7.3.1.11. *Estabilidad operacional del sistema NFsQ-CPO*

La estabilidad de las NFsQ-CPO se midió utilizando como matriz agua destilada y muestras ambientales de agua de diferente origen: 3 muestras de agua superficial, 2 muestras de agua residual tratada y 1 muestra de agua subterránea. Todas las muestras ambientales fueron filtradas, ajustadas a pH 3.0 y fortificadas con TBPPA hasta una concentración de 10 μM . La metodología de degradación del TBBPA se realizó en concordancia con lo establecido en el apartado 7.3.1.1.

Finalmente se determinó el número de ciclos en que las NFsQ-CPO conservan su actividad biocatalítica en muestras modelo a pH 3.0. En estos ensayos, al término de la reacción, la NFSQ-CPO utilizada fue extraída después de 30 min de reacción y lavada con 5 mL de amortiguador fosfatos 60 mM pH 3.0 antes de ser utilizada en un nuevo ciclo de reacción.

7.3.2. Descripción y toma de muestra de la PTAR Izúcar de Matamoros

Se recolectó información del diseño de la PTAR con el objetivo de conocer la infraestructura con la que cuenta y el proceso de depuración utilizado.

Se recolectaron muestras de agua de los efluentes de la PTAR de Izúcar de Matamoros en la temporada de lluvias y sequía, esto de acuerdo con Norma Mexicana NMX-AA-003-1980 para el muestreo de aguas residuales. La muestra fue preservada durante el transporte en un baño de hielo será almacenada a 4°C para su caracterización fisicoquímica.

7.4. Variables Respuesta

7.4.1. Diseño Factorial

Se utilizó un diseño factorial 2^3 en dos niveles de composición (inferior y superior) para su análisis mediante la metodología de superficie de respuestas por medio del programa Design Expert 11.0.0.5. La tabla 10 muestra los valores utilizados en la transformación de variables naturales en variables codificadas de acuerdo con los dos niveles de composición.

Tabla 10. Parámetros de las variables de diseño

Factor	Unidades	Nivel Inferior	Nivel Superior
Enzima	nM	10.0	50.0
Peróxido	mM	0.1	0.5
TBBPA	μM	1.0	10.0

7.4.2. Variables de entrada

Se utilizaron tres parámetros para el diseño de experimentos: cantidad de enzima, concentración de H_2O_2 y concentración de TBBPA. Las variables naturales se codificaron a partir de la ecuación 5 y de la cual se derivan las ecuaciones para las variables codificadas X_1 , X_2 y X_3 (ecuaciones 6, 7, 8) al emplear los valores de la Tabla 10

$$X_{Codif.} = \frac{X_{Actual} - \bar{X}}{(X_{NSup} - X_{NInf})/2} \quad \text{Ecuación 5}$$

Donde $X_{Codif.}$ es la variable codificada; X_{Actual} es la variable natural; \bar{X} es la media entre los valores del nivel superior e inferior del factor; X_{Ninf} y X_{Nsup} son los valores de los niveles inferior y superior de cada factor (Myers et al., 2009).

$$X_1 = \frac{Enzima - 30.0}{20.0} \quad \text{Ecuación 6}$$

$$X_2 = \frac{Peróxido - 0.3}{0.2} \quad \text{Ecuación 7}$$

$$X_3 = \frac{TBBPA - 5.5}{4.5} \quad \text{Ecuación 8}$$

7.4.3. Variables de salida

Para este diseño se utilizará como variable de respuesta a optimizar el porcentaje de degradación del TBBPA.

La Tabla 11 muestra el total de experimentos que componen el diseño factorial 2^3 que se empleará en el desarrollo de esta tesis, en ella se incluyen las variables naturales y sus respectivas codificaciones al emplear las ecuaciones 6,7 y 8.

Tabla 11. Plan de experimentación, diseño factorial 2^3

No.	Variables Naturales			Variables Codificas			Respuesta
	Enzima (nM)	Peróxido (mM)	TBBPA (μ M)	X ₁	X ₂	X ₃	Conversión (%)
1	10.0	0.10	0.10	-1	-1	-1	y ₁
2	50.0	0.10	1.0	1	-1	1	y ₂
3	10.0	0.50	0.1	-1	1	-1	y ₃
4	50.0	0.50	0.1	1	1	-1	y ₄
5	10.0	0.10	1.0	-1	-1	1	y ₅
6	50.0	0.10	0.1	1	-1	-1	y ₆
7	10.0	0.50	1.0	-1	1	1	y ₇
8	50.0	0.50	1.0	1	1	1	y ₈

7.5. Análisis estadístico

Para la contrastación de las hipótesis se aplicó un análisis de varianza (ANOVA) con un intervalo de confianza del 95% tanto en las pruebas de transformación del TBBPA, biodegradabilidad y toxicidad de los productos de reacción para detectar la existencia de diferencias significativas obtenidas para el grupo control en relación con los grupos tratados. Para las pruebas de toxicidad, las diferencias significativas entre grupos en los ensayos se establecieron mediante el modelo lineal generalizado con distribución de Poisson.

VIII. RESULTADOS

8.1. Planta de tratamiento de aguas residuales Izúcar de Matamoros

La planta de tratamiento Izúcar de Matamoros, se ubica el ejido de San Nicolas Tolentino, en el municipio de Izúcar de Matamoros, Puebla (ver Figura 11). Esta PTAR fue construida a principios del 2009, año en el cual inicio operaciones. Dicha planta trata el agua residual municipal urbana del municipio de Izúcar de Matamoros, tiene una capacidad instalada de 90 L/s y su cuerpo receptor es el Río Nexapa (SEMARNAT, 2015). Esta PTAR toma como referencia de descarga la norma oficial mexicana NOM-001-SEMARNAT-1996, que establece los límites máximos permisibles de contaminantes en las descargas de aguas residuales en aguas y bienes nacionales.

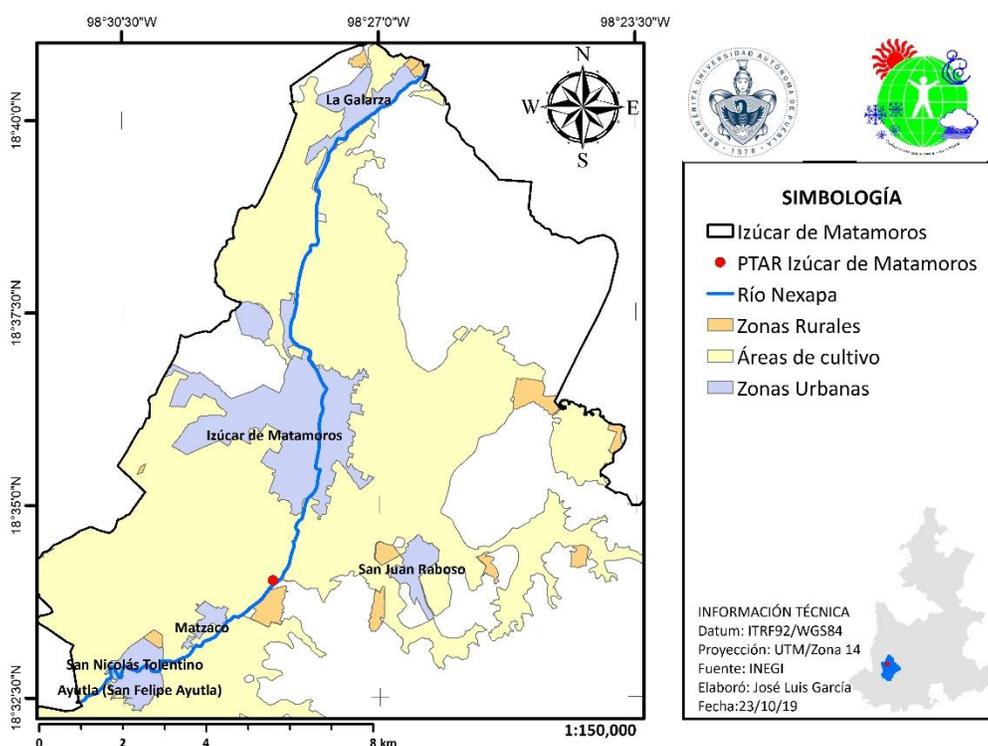


Figura 11. Mapa de ubicación de la PTAR Izúcar de Matamoros (Elaboración propia, 2019)

La construcción de la PTAR se planificó para contar con dos trenes de tratamiento idénticos con capacidad instalada de 45 L/s cada uno. Sin embargo, debido a la falta de programas de mantenimiento, actualmente opera solo una de las líneas de proceso, el cual da tratamiento a cerca del 60% de las aguas residuales del municipio (Herrera Cárdenas, 2017; SEMARNAT, 2015) el resto del efluente (40%) es derivado antes de la entrada a la PTAR para su descarga directa al Río Nexapa.

El tratamiento que se le da a las aguas residuales municipales consiste en 4 etapas: pretratamiento tratamiento primario, tratamiento secundario, desinfección, para finalmente ser descargada al Río Nexapa. El diagrama de flujo de este tratamiento se presenta en las Figuras 12 y 13a.

La depuración comienza con un cribado grueso del agua cruda, aquí se retienen los residuos más grandes por el bastidor de barras (Figura 13b). Posteriormente el agua libre de sólidos gruesos pasa al tanque de igualación con la finalidad de mantener un flujo lo más constante posible hacia el resto del tratamiento, el agua es transportada por dos bombas desde aquí hacia el tanque de desengrasado (Figura 13c) donde se recolectan todas grasas y aceites que después son concentradas en el lecho de secado, mientras que el agua que ha recibido el pretratamiento continua hacia el clarificador primario cuyo tiempo de retención es de 120 min, este tiene la finalidad de sedimentar por gravedad los sólidos más finos que posteriormente son enviados a un espesador de lodos, neutralizados con cal y luego llevados al lecho de secado para su deshidratación y disposición final en el relleno sanitario intermunicipal de Izúcar de Matamoros.

El agua clarificada continúa su recorrido hacia el tratamiento secundario que consiste en un reactor aerobio de filtros biológicos o percoladores (Figura 13d), con ambos extremos ventilados para permitir el paso de oxígeno a través de su superficie. Aquí el agua es suministrada desde la parte superior mediante un rociador rotatorio, de esta manera el material filtrante que contiene las colonias de microorganismos pasa por ciclos de inundación y de exposición al aire, permitiendo la digestión aerobia del agua residual. Una losa perforada permite la salida del agua y la recolección del exceso de lodos.

En seguida del biofiltro el agua es dirigida a un clarificador secundario (Figura 13e) en el que los sólidos en suspensión, materia orgánica restante y biomasa formada son sedimentados luego 120 min al igual que en el primer clarificador. Los lodos depositados en el fondo también son enviados al lecho de deshidratación. Como última etapa, el agua residual tratada pasa por un tanque de cloración (Figura 13f) para su desinfección y finalmente es descargada en el Río Nexapa (Figura 13g).

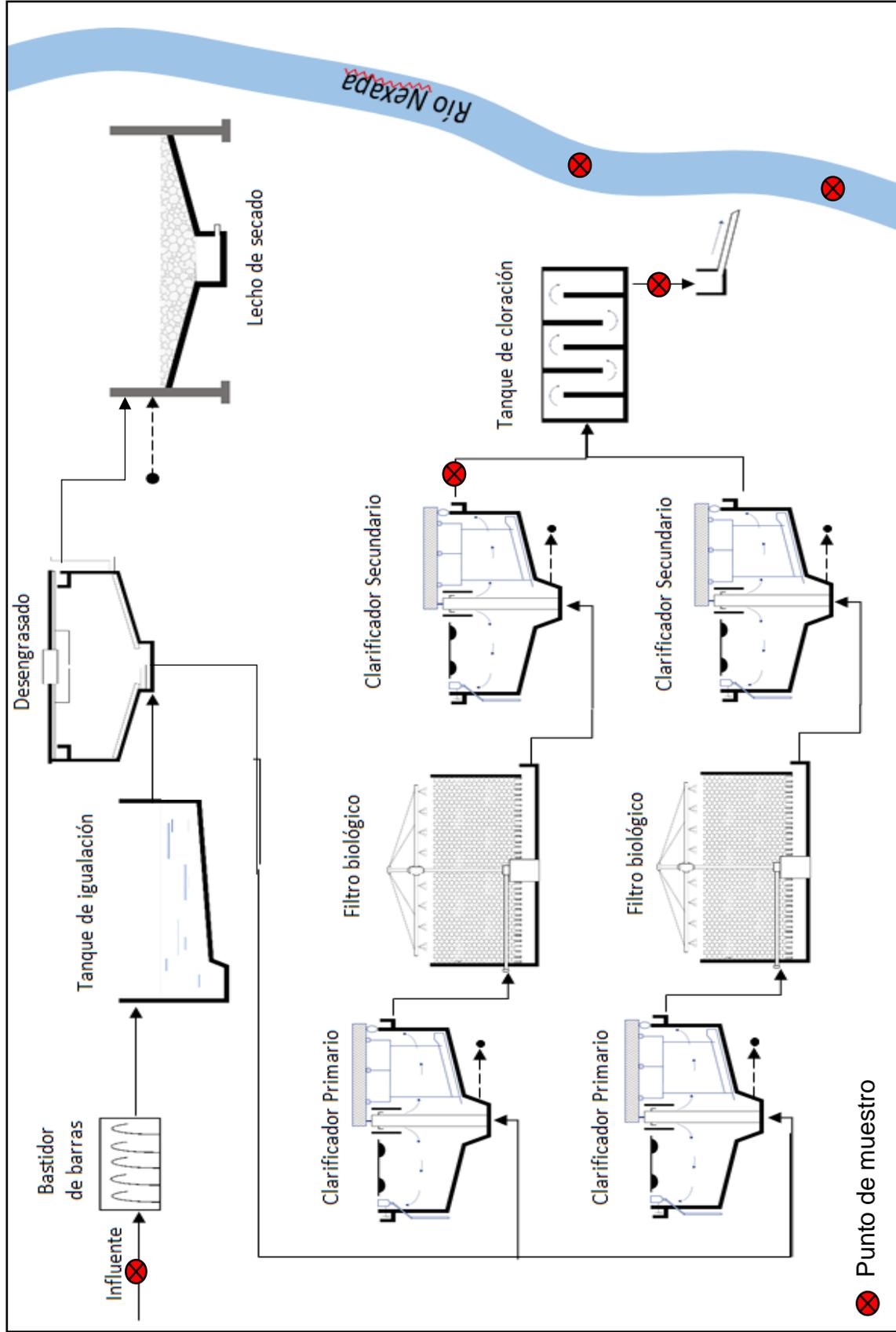


Figura 12. Diagrama de flujo de la PTAR Izúcar de Matamoros, Puebla y puntos de muestreo (Elaboración Propia, 2019).



Figura 13 a-g. Etapas en el tratamiento de aguas residuales en PTAR Izúcar de Matamoros. (Elaboración propia, 2019).

Por otra parte, la toma de muestra de agua residual, residual tratada y superficial se realizó conforme lo establecido en la Norma Oficial Mexicana NMX-AA-3-1980. Se realizaron tres muestreos correspondientes a la temporada de lluvias y estiaje en los meses de junio 2018, enero 2019 y mayo 2019, en diferentes puntos dentro del tren de tratamiento, así como en el cuerpo receptor antes y después de la descarga de la PTAR. Los puntos de muestreo se presentan en la Figura 28.

La caracterización de las muestras tuvo como finalidad conocer: 1) la situación actual de las descargas de la PTAR; 2) determinar las características fisicoquímicas del agua que pudieran generar posibles interferencias en el tratamiento biocatalítico propuesto en el trabajo de tesis y 3) la detección del retardante flama TBBPA seleccionado como compuesto modelo. Adicionalmente, se tomaron muestras de agua del río antes y después de la descarga de la PTAR, para conocer el impacto de la descarga en el cuerpo de agua.

Los parámetros fisicoquímicos medidos fueron: Demanda Química de Oxígeno, Demanda Biológica de Oxígeno, pH, conductividad eléctrica, sólidos suspendidos totales, nitratos, fosfatos, sulfatos, cloro libre, calcio, níquel y hierro. Cada uno de estos parámetros fue comparado de acuerdo con la normatividad vigente aplicable.

Cabe destacar que, durante el primer muestreo realizado en junio 2018, la PTAR se encontraba fuera de actividades debido a labores de reparación de las bombas principales del cárcamo de bombeo. Por esta razón el 100% del caudal del agua residual procedente de la descarga municipal, era derivado para ser vertido directamente al río Nexapa. Bajo estas condiciones de nula operación, las muestras de agua correspondientes al tratamiento secundario se tomaron de la masa de agua retenida en esta unidad de tratamiento; mientras que las muestras correspondientes al influente y descarga de la PTAR se consideraron idénticas al no recibir tratamiento alguno.

Por otro lado, en el muestreo correspondiente a enero 2019, la reparación de las bombas había sido completada, sin embargo, la planta operaba de manera intermitente debido a que las descargas de agua residual municipal no eran suficientes para mantener

un caudal constante; razón por la cual la planta debía de suspender operaciones hasta lograr el llenado del tanque igualador que le permitiera reanudar operaciones.

Finalmente, en el tercer muestreo correspondiente a mayo 2019, la PTAR funcionaba de manera continua. Sin embargo, cabe destacar que al igual que en las visitas anteriores, la planta opera con solo una línea de proceso, es decir, con la mitad de la capacidad instalada. De acuerdo con la SEMARNAT (2015), esta PTAR se encuentra en proceso de rehabilitación.

Los resultados correspondientes a esta caracterización se muestran en la Figuras 12a-l. En estas gráficas se hace una comparación de cada uno de los parámetros medidos en el tren de tratamiento y en zona de descarga de la PTAR durante los tres muestreos y se comparan con el límite máximo permisible (en rojo) establecido en las normas mexicanas aplicables mostrados en la Tabla 12.

Tabla 12. Límites máximos permisibles de descarga (Elaboración propia, 2019)

Parámetro	Límite máximo permisible	Norma
DQO (mg O ₂ /L)	210	NOM-001-SEMARNAT-1996
DBO (mg O ₂ /L)	150	NOM-001-SEMARNAT-1996
pH	5 a 10	NOM-001-SEMARNAT-1996
Conductividad (μS/cm)	1000	CE-CCA-001/89
Sólidos suspendidos (mg/L)	150	NOM-001-SEMARNAT-1996
Nitratos NO ₃ ¹⁻ (mg/L)	40	NOM-001-SEMARNAT-1996
Fosfatos PO ₄ ³⁻ (mg/L)	20	NOM-001-SEMARNAT-1996
Sulfatos SO ₄ ²⁻ (mg/L)	130*	CE-CCA-001/89
Cloro libre (mg/L)	0.2 a 1.5	NOM-127-SSA1-1994
Calcio Ca ²⁺ (mg/L)	500†	NOM-127-SSA1-1994
Níquel Ni ²⁺ (mg/L)	2 a 4 (0.2**)	NOM-001-SEMARNAT-1996
Hierro Fe ³⁺ (mg/L)	5	NOM-CCA-32-ECOL-1993

* Riego agrícola.

** De acuerdo con NOM-CCA-32-ECOL-1993.

† Dureza total en forma de CaCO₃.

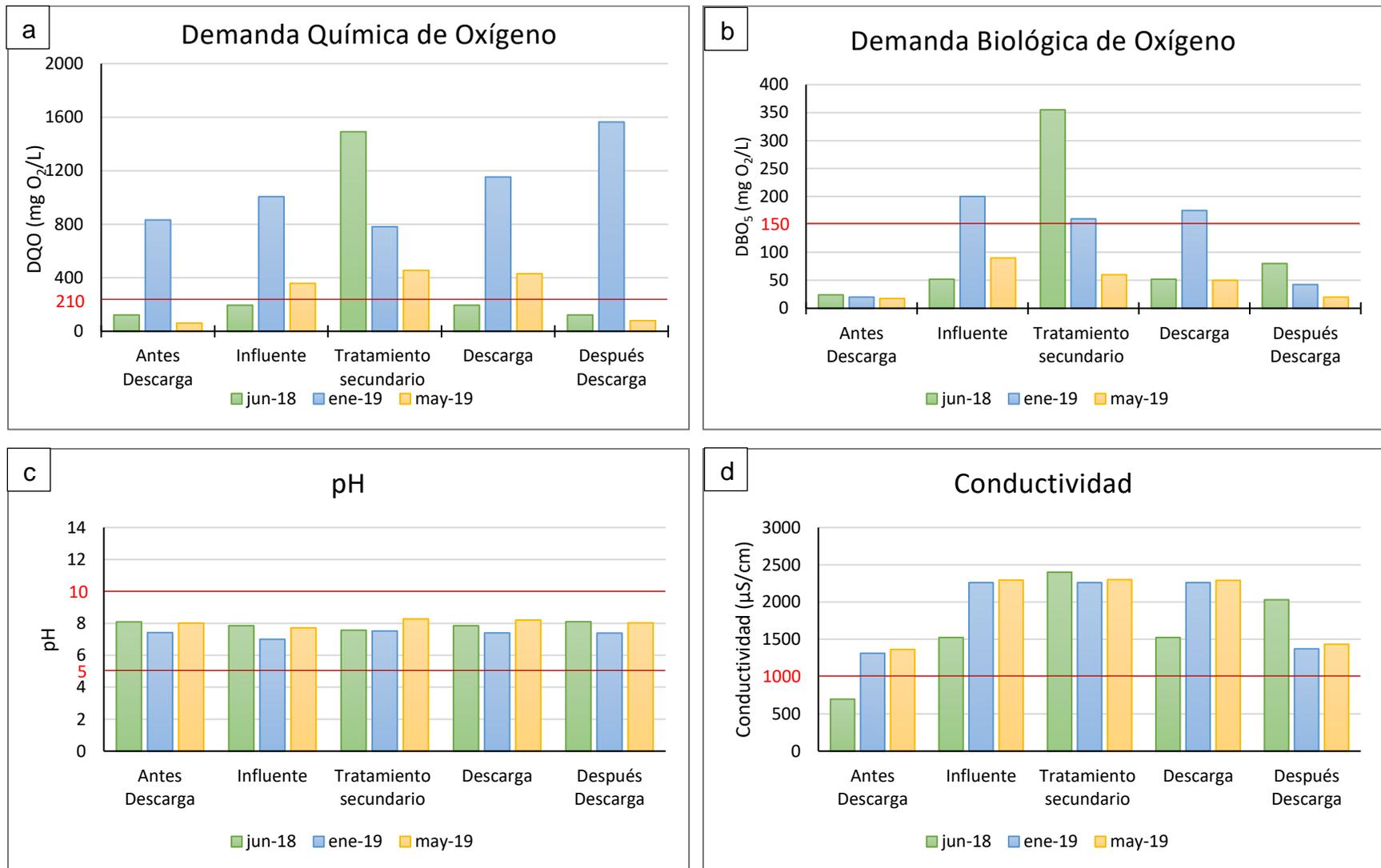


Figura 14. Caracterización de agua superficial y residual tratada (Elaboración Propia, 2019).

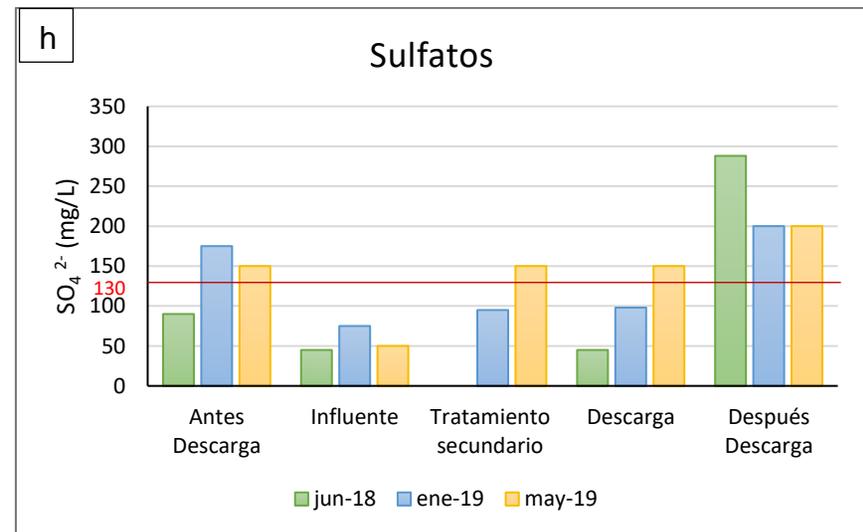
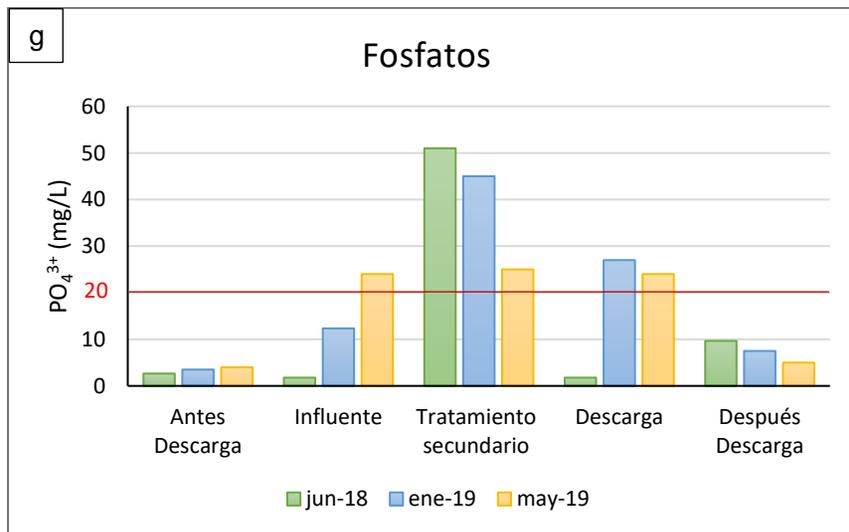
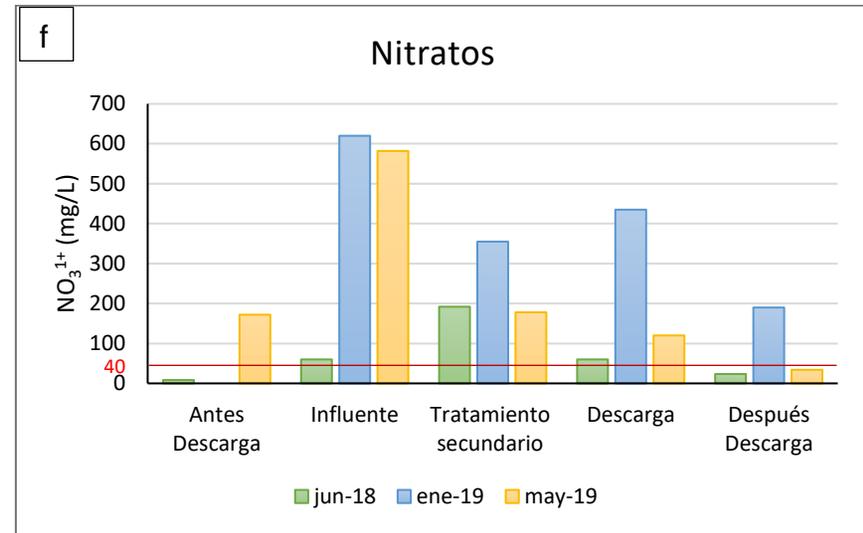
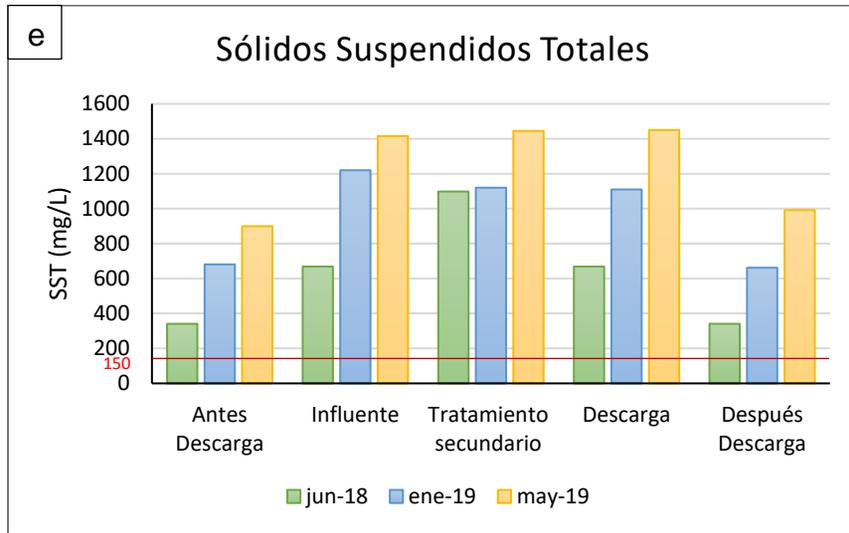


Figura 14. Caracterización de agua superficial y residual tratada (Continuación)

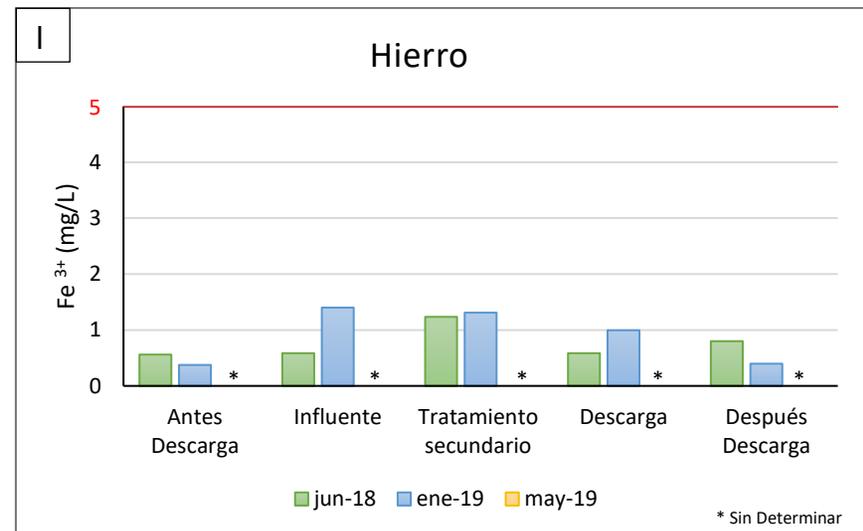
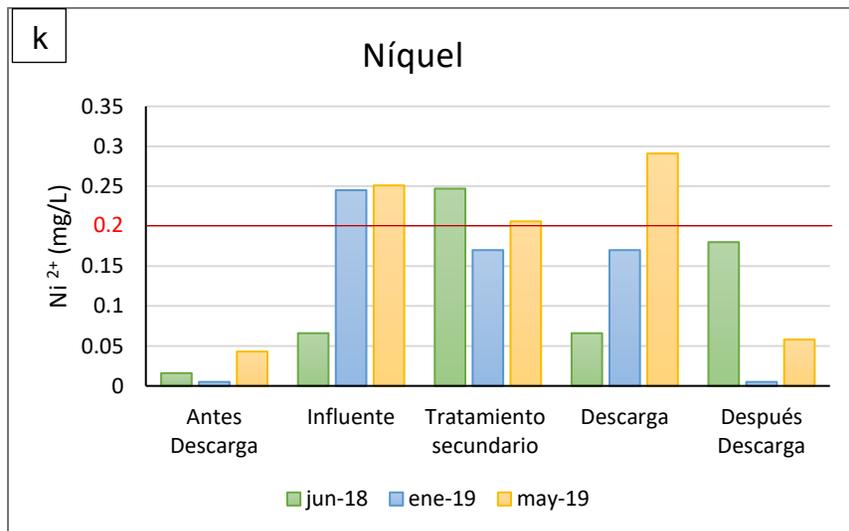
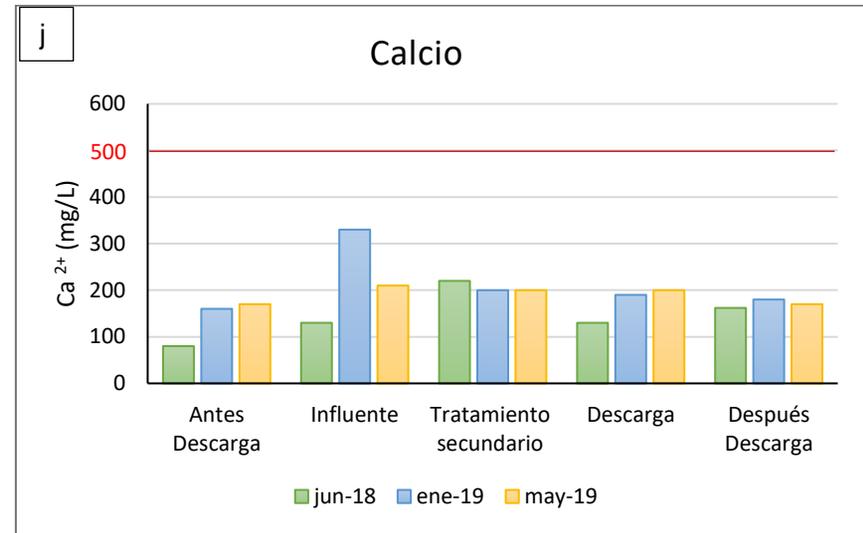
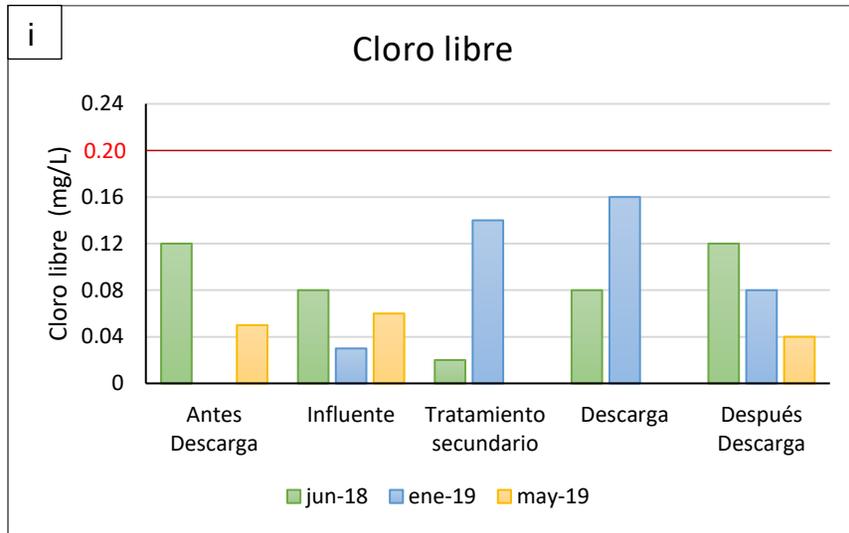


Figura 14. Caracterización de agua superficial y residual tratada (Continuación).

De forma general, los resultados anteriores ponen en evidencia que el tratamiento que las aguas residuales reciben en la PTAR Izúcar de Matamoros, como era de esperarse, presenta deficiencias cuando esta no opera de manera continua y que de acuerdo con lo reportado por Morgan (2016) es un problema recurrente en las PTAR del país, debido principalmente a falta de programas de financiamiento, reparación y mantenimiento entre otros factores.

Del mismo modo se puede observar que la operación continua de la PTAR proporciona un tratamiento que comparado con el modo de operación intermitente, resulta en términos generales más eficiente; sin embargo, es de suma importancia recalcar que, los valores de descarga de la planta son mayores que sus contrapartes a la entrada en casi todos los parámetros medidos; y por consiguiente no cumplen con lo dispuesto en el PROY-NOM-001-SEMARNAT-2017. Esta condición puede deberse a la subutilización de la infraestructura disponible en el tren de tratamiento, ya que la falta de mantenimiento y reparación al reactor biológico (figura 13d), indispensable en la depuración de las aguas residuales, ha generado que el agua solo sea dispersada en cuatro zonas específicas por debajo del rociador; lo cual implica que el tratamiento en esta unidad es deficiente debido a que la capacidad de tratamiento disponible está muy por debajo de la capacidad para la cual fue diseñada este equipo.

Estos resultados sugieren que la PTAR Izúcar de Matamoros, actúa como una fuente de contaminación a su cuerpo receptor, debido a la deficiencia en el tratamiento por la falta de rehabilitación a la infraestructura de la PTAR; sin embargo, será necesario realizar estudios espacio-temporales que corroboren esta proposición, ya que de acuerdo con Aguilar Hernández (2013), esta planta operaba dentro de los parámetros de descarga establecidos en la NOM-001-SEMARNAT-1996 con la mitad de la capacidad instalada, como sucede actualmente.

No obstante, este resultado no deberá de interpretarse como una premisa que ocasione la interrupción de operaciones de la PTAR, sino como un antecedente que permita tomar acciones en la gestión integral de aguas residuales en la subcuenca del Río Nexapa como propone Navarro et al. (2007); ya que la presencia de aguas residuales no tratadas o parcialmente tratadas vertidas en cuerpos de agua, representan un riesgo

a la salud pública, y al medio ambiente; debido principalmente al exceso de nutrientes y contaminantes presentes en dichas aguas, ocasionando afectaciones a los organismos acuáticos, eutrofización y zonas muertas (UNESCO, 2017); así como, al uso que se le da al agua extraída del Río Nexapa en otras actividades económicas como lo son riego agrícola en las comunidades de Matzaco, San Felipe Ayutla, y San Nicolás Tolentino (ver Figura 9) así como en usos públicos, urbano, doméstico e industrial; siendo el uso agrícola el destino del 94% del agua extraída del cuerpo de agua (Navarro et al., 2007; Navarro, Herrera, Marrugo, Bayona, & Morales, 2014)

Por otra parte, se analizaron por espectrometría de masas las muestras ambientales después de ser concentradas 100 veces. Esto permitió la detección del TBBPA en las aguas residuales municipales y residual tratada, no así en el cuerpo de agua previo la descarga de la PTAR. Los resultados de este análisis se muestran en la tabla 13.

Tabla 13. Análisis por HPLC-ESI/QTOF-MS para detección de TBBPA

Muestra	Masa de Picos m/z
Patrón (TBBPA)	542.7259
Antes de descarga	*
Influyente	+
Tratamiento Secundario	+
Descarga	+

* TBBPA en concentración menor al límite de detección

+ Contiene TBBPA

Debido a las aplicaciones industriales que se tienen reportadas para este retardador de flama principalmente componentes electrónicos, recubrimiento de cables y plásticos de productos eléctricos (De Wit, 2002; Malkoske et al., 2016), que sumados a la nula presencia de industria de síntesis y de aplicación del TBBPA en la zona (INEGI, 2017; Yamauchi, 2017; Zhou et al., 2014), la presencia de este compuesto podría deberse parcialmente a la volatilización del TBBPA contenido en productos electrónicos; pues debido a su carácter fenólico es absorbido en el polvo de los hogares y oficinas, llegando a la descarga municipal por las labores de limpieza cotidianas (Malkoske et al., 2016; Peng, Wang, Wei, Huang, & Jia, 2017; Zhou et al., 2014).

La presencia de TBBPA reportada en este estudio, se suma a una lista de 398 contaminantes reportados por Navarro et al. (2014), entre los que destacan productos de aseo y cuidado personal, fármacos, alquilfenoles, detergentes, plaguicidas e hidrocarburos aromáticos.

Es por la situación anteriormente expuesta que se hace necesario generar información técnico-científica que permita comprender el impacto ambiental ocasionado por los RF; así como, el desarrollo de tecnología sustentable que permita disminuir la presencia de dichos compuestos en efluentes de las PTAR al complementar los tratamientos actuales cuyas deficiencias técnicas, de operación o diseño acentúan el impacto antropogénico sobre las aguas del río Nexapa, lo que se traduce en un mayor riesgo ambiental y a la salud humana si se considera el uso para riego agrícola al que se destinan estas aguas, sumado a la detección de diversos contaminantes en pozos de agua subterránea de las comunidades cercanas a la PTAR (Navarro et al., 2014).

8.2. Oxidación enzimática del TBBPA mediante Cloroperoxidasa

Se ensayó la capacidad oxidativa de la enzima Cloroperoxidasa (CPO) de *Caldariomyces fumago* sobre el TBBPA como sustrato, esto de acuerdo con la metodología descrita en el apartado 7.3.1.1. En la Figura 15 se muestra el cromatograma correspondiente a la reacción de oxidación enzimática del TBBPA. Se puede observar que el tiempo de retención se ubicó a los 10.36 minutos para este compuesto, además de una clara disminución del área, lo cual es indicativo de la transformación del sustrato por la enzima. De esta forma, al monitorear los cambios de área en este pico es posible cuantificar el sustrato oxidado por la enzima, ya que la medida del decremento del área es directamente proporcional a la disminución de la concentración del compuesto, que para este caso es equivalente a una conversión del 93.5% a los 30 minutos de reacción. Así mismo se puede apreciar la aparición de nuevos picos a tiempos de retención inferiores, esto debido a la generación de los productos de reacción. Porcentajes similares de transformación del TBBPA fueron reportados por Feng, Lu, Gao, & Mao (2017) para las enzimas oxidorreductadas HRP (95%) y Lacasa (82%) en 30 minutos

para ambos casos , lo cual pone de manifiesto la alta capacidad de transformación de la CPO.

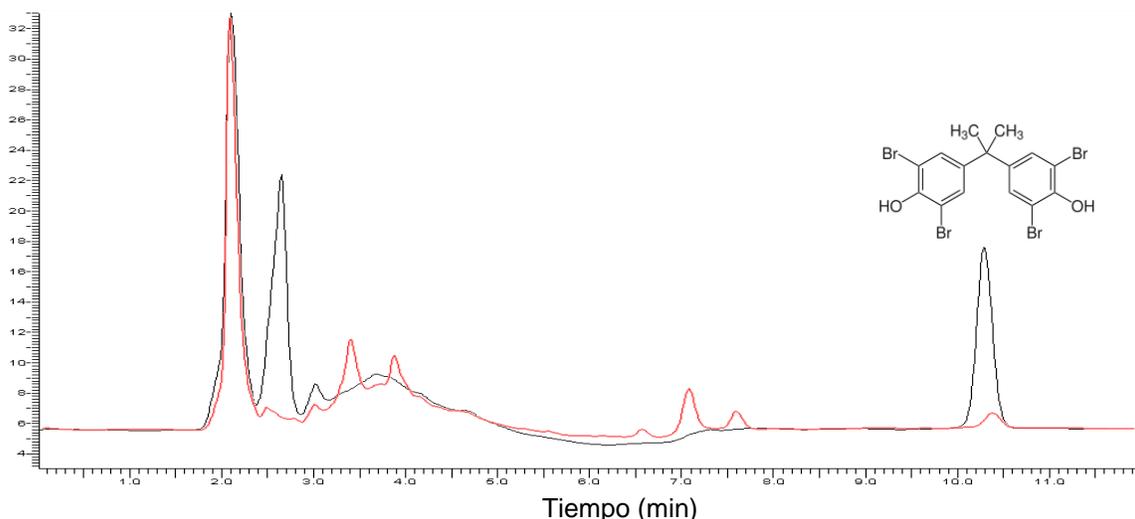


Figura 15. Oxidación enzimática del TBBPA por CPO antes (negro) y después (rojo) de la oxidación enzimática (Elaboración propia, 2018).

Posteriormente se determinó la constante cinética de primer orden (k), la cual es una constante de proporcionalidad entre la velocidad de reacción y la concentración, que permite determinar a la primera en función del valor de la segunda (Andres Illanes, 2008). El valor de k se obtuvo al construir una curva de oxidación para el TBBPA y realizar un ajuste no lineal a un modelo exponencial con ayuda del software OriginPro 8.6.0, el valor de k se ubicó en 0.11951 min^{-1} con un $R^2 = 0.983$, lo cual indica un buen ajuste.

En la Figura 16 se muestra el avance de la reacción de oxidación del TBBPA en volumen de 1 mL, se puede observar que la reacción de oxidación enzimática se lleva a cabo de forma rápida durante los primeros minutos de reacción y disminuye su velocidad con el paso del tiempo alcanzando una conversión del 93.5% después de 30 min. Para este estudio, no es necesario la caracterización cinética completa, es decir, la obtención de las constantes de Michaelis Menten ya que la concentración del TBBPA utilizado es muy baja ($1 - 10 \mu\text{M}$), por lo que la CPO eventualmente presentaría un comportamiento de una reacción de primer orden.

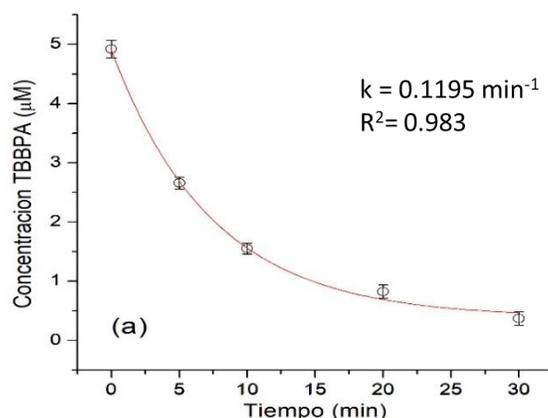


Figura 16. Cinética de reacción del TBBPA por CPO (Elaboración propia, 2018).

8.3. Productos de reacción

8.3.1. Identificación

Con la finalidad de evaluar la seguridad ambiental de la transformación enzimática, se realizó la identificación de los productos de reacción mediante cromatografía de líquidos acoplado a masas HPLC-ESI/QTOF-MS. Los resultados de estas pruebas permitieron identificar sólo 4 productos debido a efectos de la matriz, lo que generó el solapamiento de los picos imposibilitando la detección del ion molecular. Los productos identificados se muestran en la tabla 14.

Tabla 14. Productos de degradación enzimática del TBBPA por CPO

Formula	m/z	Estructura	Error (ppm)	Referencia
$C_{39}H_{10}Br_2O_2$	309.9053		2.49	(Feng et al., 2017)
$C_{17}H_{17}Br_3O_2$	493.8289		16.25	(Sun et al., 2014)

Los resultados de la tabla anterior muestran la deshalogenación del TBBPA y la metilación de los grupos hidroxilo, además de la apertura de uno de los anillos fenólicos. Estas especies han sido reportados por Feng et al. (2017) y Sun et al. (2014) como productos de transformación del TBBPA por las enzimas HRP y lacasa además de otros productos deshalogenados y polimerizados; por su parte Han et al. (2019) reportó las especies aquí identificadas como productos de degradación por ozonización.

Es importante mencionar que algunos estudios recientes, reportan la toxicidad de los productos de degradación por ozonización, oxidación fotocatalítica y reacciones Fenton (Han et al., 2019; Hou et al., 2018; Malkoske et al., 2016), siendo los productos intermediarios deshalogenados más tóxicos que el TBBPA sin tratar o los productos de degradación finales. Es por esta razón que se realizaron pruebas toxicológicas y de biodegradabilidad que permitieran dilucidar el posible riesgo ambiental ocasionado por la técnica de remediación propuesta en esta investigación.

8.3.2. Biodegradabilidad

Se determinó el índice de biodegradabilidad de TBBPA y los productos de reacción enzimática tomando como referencia las especificaciones del test de biodegradabilidad 301D de la Organización para la Cooperación y Desarrollo Económico (OECD, 1992). El cálculo del índice de biodegradabilidad fue realizado sustituyendo la demanda teórica de oxígeno (DThO) por el valor experimental de DQO, esto debido a la dificultad presentada en la separación e identificación de los productos de reacción como se menciona en el apartado anterior.

Un primer acercamiento a la posible toxicidad del TBBPA y de los productos de reacción fue realizado mediante el cálculo de la inhibición de la respiración aerobia de los microorganismos no adaptados; para ello, se utilizaron muestras de agua del río Nexapa como inóculo en la degradación de un control de glucosa-ácido glutámico ($DBO_5 = 198 \text{ mg O}_2/\text{L}$, NMX-AA-028-SCFI-2001) de acuerdo con lo establecido en el Anexo II de la prueba 301D de la OCDE. Los resultados para este ensayo se presenten en la tabla 15.

Tabla 15. Biodegradabilidad del TBBPA antes y después del tratamiento enzimático

Muestra	DBO ₂₈ (mg O ₂ /L)	DQO (mg O ₂ /L)	Índice de Biodegradabilidad	Inhibición de la respiración* (%)
TBBPA	21.7	308.0	7.0	80.6
Productos de reacción	95.0	121.5	78.2	26.5

* La inhibición fue calculada como: $[1 - \text{DBO}_{\text{control glucosa}} / \text{DBO}_{\text{control glucosa/TBBPA o productos}}] \times 100$

Los resultados de estas pruebas muestran una relación inversa entre la DBO y DQO, lo cual puede explicarse debido a que el tratamiento enzimático genera productos de reacción más fácilmente metabolizados por los microorganismos presentes, lo que implica un mayor consumo de oxígeno resultado del metabolismo de dichos microorganismos en comparación con TBBPA sin transformar, el cual resulta menos biodegradable.

La premisa anterior puede ser corroborada por el índice de biodegradabilidad de los productos de reacción, el cual se situó 11 veces por encima del índice de biodegradabilidad del TBBPA. Este resultado puede explicarse parcialmente por el hecho de que la inhibición de la respiración microbiana se ve inhibida cerca del 80% en presencia de este compuesto, lo que sugiere que el TBBPA actúa como inhibidor del metabolismo de los microorganismos y/o presenta un efecto tóxico para los microorganismos presentes en el cuerpo de agua, lo cual ha sido reportado por diferentes estudios en efluentes de PTAR con presencia de RF fosforados y halogenados (Bolong, Ismail, Salim, & Matsuura, 2009; Cristale et al., 2013; Ezechiá, Covino, & Cajthaml, 2014; Malkoske et al., 2016).

Por otra parte, se muestra que los productos enzimáticos son en apariencia menos tóxicos, ya que exhiben una inhibición de la respiración microbiana del 26.5%. Sin embargo, los resultados de estas pruebas no pueden interpretarse como una prueba de toxicidad verdadera, razón por la cual se realizaron las pruebas toxicológicas correspondientes que permitieran dar certeza es los resultados aquí obtenidos.

8.3.3. Toxicidad

Los ensayos biológicos son herramientas de diagnóstico que permiten determinar los efectos de agentes químicos y físicos sobre organismos de prueba (biomodelos). Estos efectos pueden manifestarse en alteraciones del crecimiento, proliferación, cambios morfológicos, fisiológicos e incluso la muerte del organismo; afectando desde las rutas metabólicas y estructuras celulares, hasta individuos completos, poblaciones o comunidades (Morales Castillo, 2004).

De acuerdo con Morales Castillo (2004), la toxicidad puede definirse como la capacidad de una sustancia para ejercer un efecto nocivo sobre un organismo y dependerá tanto de las propiedades químicas del compuesto como de su concentración, duración y frecuencia de exposición al tóxico. Lo cual proporciona información valiosa en el proceso de evaluación de riesgos ambientales.

Por ello, para este estudio se realizaron pruebas toxicológicas utilizando como organismo modelo *Artemia salina*, el cual es considerado un modelo biológico de gran importancia en estudios toxicológicos debido a la alta sensibilidad a compuestos químicos, así como a su fácil manipulación y mantenimiento en condiciones de laboratorio, disponibilidad de organismos sin necesidad de cultivo, buen conocimiento de sus características biológicas, tamaño pequeño que permite reducción de los volúmenes de ensayo y respuestas altamente reproducibles y comparables con organismos de pruebas estandarizadas como *Daphnia magna*, *Vibrio fischeri*, *Danio rerio*, entre otros (Agudelo, Gaviria-Restrepo, Barrios-Ziolo, & Cardona-Gallo, 2018; Libralato, Prato, Migliore, Cicero, & Manfra, 2016; Morales Castillo, 2004).

Para determinar la posible toxicidad de los productos de reacción y compararlos con el compuesto sin modificar (TBBPA) estas pruebas fueron realizadas de acuerdo con lo establecido en el apartado 7.3.1.5. Las curvas dosis-respuesta para la exposición a temperatura de 21 °C y 28 °C se presentan en la figura 17 y 18 respectivamente.

En la figura 15 se observa que la mortalidad máxima registrada para *Artemia salina* expuesta a TBBPA (36.8 µg/L) durante 24 horas es de 57.7%, este valor de mortalidad incrementa al 98.2 % después de 48 horas de exposición. El análisis de varianza para

las 12 repeticiones en cada nivel (0.92, 2.3, 4.6, 9.2, 13.8, 18.4, 23.0, 27.6, 32.2 y 36.8 $\mu\text{g/L}$) no mostró diferencias significativas ($p > 0.05$) entre repeticiones; no así entre los tiempos de exposición ($p < 0.05$) por lo que la LC_{50} del TBBPA calculada se situó en 29.86 $\mu\text{g/L}$ y 19.18 $\mu\text{g/L}$ para 24 y 48 horas de exposición respectivamente.

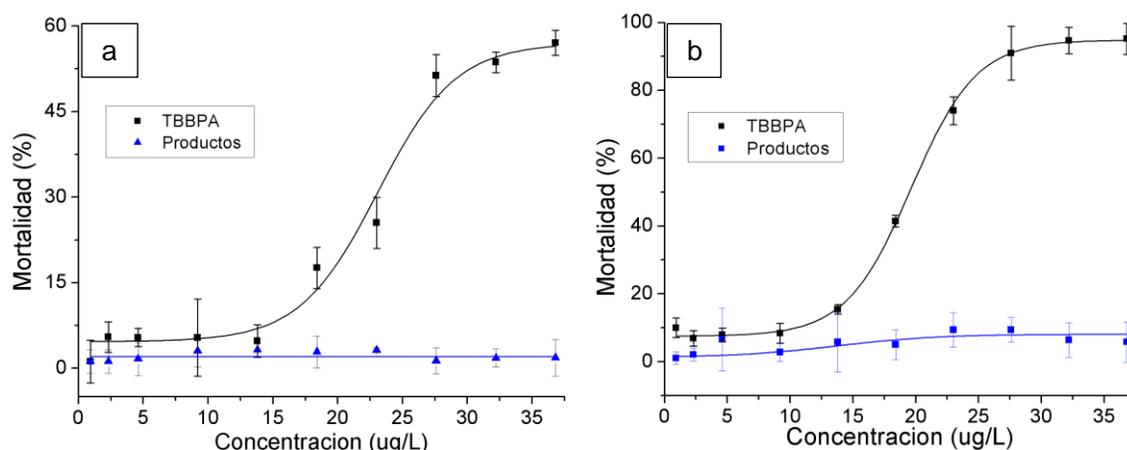


Figura 17. Curvas dosis-respuesta para *Artemia salina* expuesta durante 24 h (a) y 48 h (b) a TBBPA y productos de reacción; temperatura 21 °C (Elaboración propia, 2019)

Por otra parte, se puede observar que la curva dosis-respuesta para la toxicidad de los productos de reacción a la misma concentración y tiempo de exposición que el TBBPA es nula en este intervalo de trabajo, por lo cual no fue posible calcular la LC_{50} para los productos de reacción; sin embargo, se puede afirmar que los productos de reacción biocatalítica son significativamente menos tóxicos ($p < 0.05$) que su contraparte sin modificar.

En la figura 18 se presenta la curva dosis-respuesta correspondiente a la exposición a temperatura de 28 °C para los mismos compuestos (TBBPA y productos de reacción); se puede observar que la mortalidad a la concentración máxima ensayada (36.8 $\mu\text{g/L}$) incrementa del 54.7% al 90.8% correspondientes a 24 y 48 horas de exposición. El análisis del modelo lineal generalizado con distribución de Poisson para estas pruebas mostró que los organismos se encuentran mejor adaptados a esta temperatura, lo que resulta en una menor mortalidad de los organismos expuestos. De acuerdo con Carvalho (2006), el género *Artemia* puede sobrevivir a temperaturas de 15 a 32 °C, y se encuentra mejor adaptado a temperatura de 26 °C.

De manera similar, el análisis estadístico no mostró diferencias significativas entre repeticiones ($p > 0.05$), no así entre los tiempos de exposición ($p < 0.05$) con lo cual la LC_{50} se situó en $31.91 \mu\text{g/L}$ y $24.47 \mu\text{g/L}$ para 24 y 48 horas de exposición respectivamente. Al igual que en el caso anterior, la LC_{50} de los productos de reacción no pudo ser calculada debido a la menor toxicidad de estos a las concentraciones de TBBPA evaluadas.

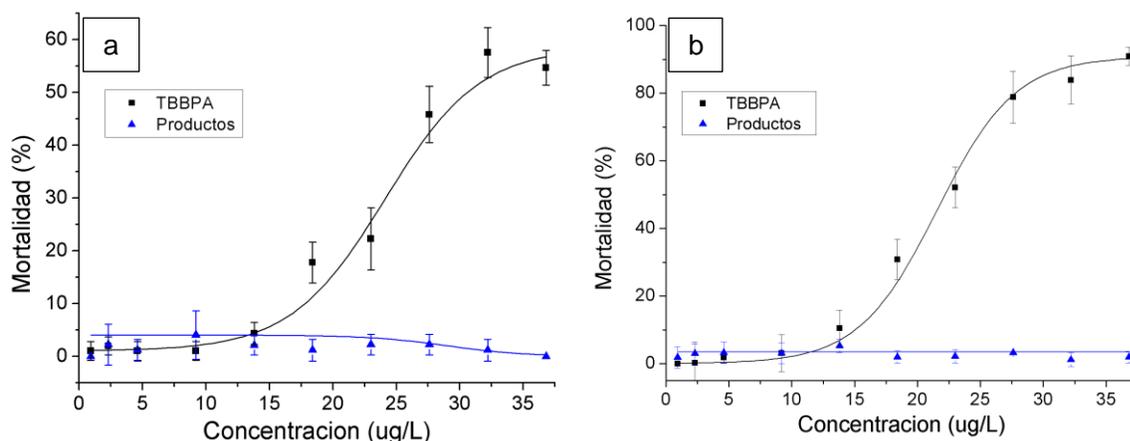


Figura 18. Curvas dosis-respuesta para *Artemia salina* expuesta durante 24 h (a) y 48 h (b) a TBBPA y productos de reacción; temperatura $28\text{ }^{\circ}\text{C}$ (Elaboración propia, 2019).

Es importante mencionar que el 100% de los nauplios expuestos a H_2O_2 murieron dentro de las primeras 24 horas al ser expuestos a dosis idénticas a las encontradas en la solución de TBBPA sin tratar ($36.8 \mu\text{g/L}$) equivalente a $0.72 \mu\text{M}$ de H_2O_2 ; sin embargo, los organismos expuestos a la solución de reacción (equivalente a la misma concentración de TBBPA) presentaron una mortalidad menor al 3.0% para 24 y 48 horas de exposición. Esta disminución en la mortalidad puede explicarse debido a que la CPO utiliza H_2O_2 en su ciclo catalítico, disminuyendo la concentración de H_2O_2 con el avance de la reacción.

De manera similar, los nauplios expuestos a la solución de reacción sin diluir (equivalente a 5.44 mg/L), presentaron una mortalidad del 100% dentro de las primeras 24 horas. Esto sugiere la toxicidad de los productos de reacción, sin embargo, será necesario realizar nuevas pruebas con intervalos de concentración más amplios a los utilizados en este estudio, que permitan determinar la LC_{50} ; ya que como se demuestra

con los resultados anteriores, la toxicidad de los productos es menor al 3.2% a la concentración a la que el TBBPA causa la muerte del 100% los organismos.

Resultados similares en la disminución de la toxicidad del TBBPA fueron reportados recientemente por Han et al., (2019) utilizando *D.magna* y *V. fisheri* como organismos de prueba. La toxicidad del TBBPA disminuyó de 47.67 UT a un máximo 1.0 UT para los productos de reacción, después de utilizar la ozonización como técnica de degradación del TBBPA. Es importante mencionar que algunos productos de reacción reportados en el apartado 8.3.1. de esta tesis, también se encuentran reportados como productos de degradación por la metodología propuesta por Han et al., (2019), lo cual confirma que los productos de degradación son menos tóxicos; sin embargo, como se mencionó con anterioridad, será necesario realizar pruebas de toxicidad con intervalos de concentración más amplios que permitan cuantificar la LD₅₀.

De manera contrastante con los resultados presentados, la LD₅₀-48h reportada por la Unión Europea se sitúa en 960 µg/L utilizando *D. magna* como organismo modelo (40-50 veces superior a los valores aquí obtenidos), concluyendo que el TBBPA no representa riesgos para la salud humana ni para el medio ambiente cuando es utilizado de forma reactiva y presenta bajo riesgo ambiental cuando es utilizado en forma aditiva (European Commission, 2008). Esta conclusión se contrapone con resultados recientes reportados por nuevas investigaciones toxicológicas y de distribución ambiental (Malkoske et al., 2016; Waaijers et al., 2013; Yang, Xu, & Zhao, 2013; Zhou et al., 2014) así como en la selección de organismos más sensibles a RF para su toxicológica como: *V.fisheri*, *D. rerio*, *P.subcapitata*, *T. platyurus*, *H.attenuata*, *A. salina* o células de *O. mykiss* (Debenest et al., 2010; Han et al., 2019; Libralato et al., 2016; Martín-Villamill, Torres Gavila, & Varó Vaello, 2016; McCormick, Paiva, Häggblom, Cooper, & White, 2010; Molina-Salinas & Said-Fernández, 2006).

8.4. Nanofibras de quitosano/ alcohol polivinílico

8.4.1. Morfología

Los estudios de morfología se realizaron de acuerdo con lo establecido en el apartado 7.3.1.8.1 y con dos tipos de inyectoros diferentes (aguja y carrusel) con el fin de estudiar la estructura, distribución y diámetro de las fibras electrohiladas. En la Tabla 16 se muestran los diferentes parámetros de trabajo en la formación de las películas de nanofibras, así como las micrografías y observaciones correspondientes.

Tabla 16. Parámetros experimentales de electrohilado (Elaboración propia, 2018).

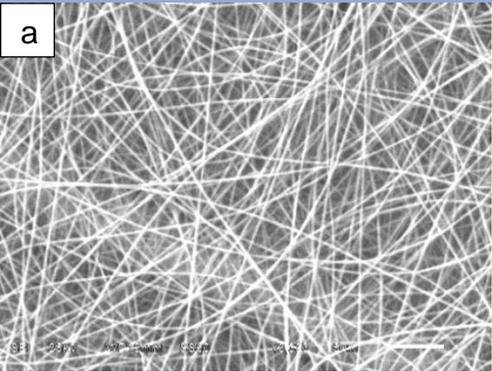
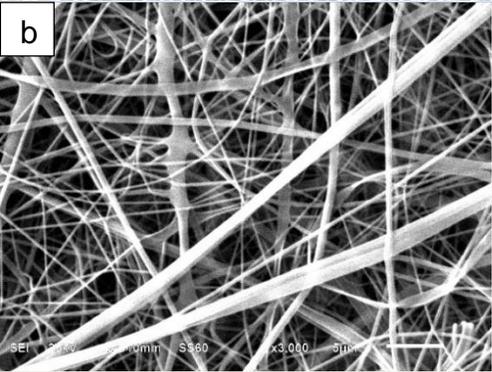
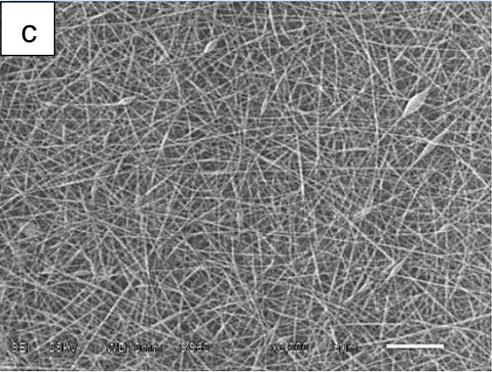
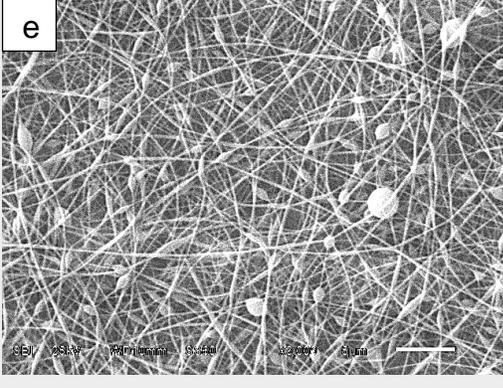
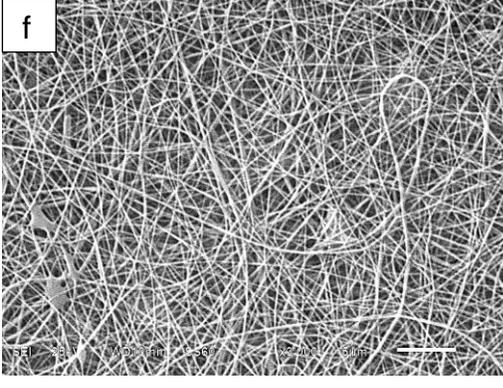
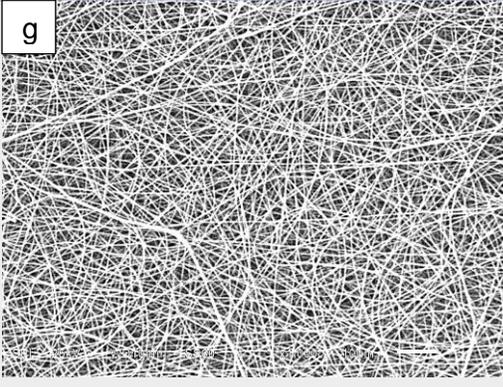
Micrografía	Parámetros de electrohilado	Observaciones
	<p>Muestra: AA-010 Tipo de inyector: Aguja Potencial eléctrico: 25kV Flujo: 0.2 mL/min Distancia: 20 cm Tiempo: 30 min Humedad: 23% Solución de procedencia: 100% PVA</p>	<p>Las fibras presentan una morfología cilíndrica uniforme sin presencia de bulbos; con diámetro medio de 312.9 nm en un intervalo de 211 a 422 nm</p>
	<p>Muestra: RA-010 Tipo de inyector: Carrusel Potencial eléctrico: 25kV Flujo: S/D* Distancia: 10 cm Tiempo: 30 min Humedad: 27% Solución de procedencia: 100% PVA</p>	<p>Las fibras presentan morfología irregular con ramificaciones y sin presencia de bulbos. Diámetro medio de 496.76 en un intervalo de 97 a 1886 nm.</p>
	<p>Muestra: AC-310 Tipo de inyector: Aguja Potencial eléctrico: 20kV Flujo: 0.2 mL/min Distancia: 20 cm Tiempo: 60 min Humedad: 25% Solución de procedencia: 3% QS, 10% PVA, relación 1:1</p>	<p>Las fibras presentan bulbos bien definidos de tamaño variable de 726 nm de ancho por 1663 nm de largo hasta 1044 x 3200 nm; diámetro medio de fibras de 222 nm y distribución normal en un intervalo de 106 a 346 nm.</p>

Tabla 16. Parámetros experimentales de electrohilado (Elaboración propia, 2018).

Micrografía	Parámetros de electrohilado	Observaciones
	<p>Muestra: RD-310 Tipo de inyector: Carrusel Potencial eléctrico: 20kV Flujo: S/D* Distancia 10 cm Tiempo: 30 min Humedad: 32% Solución de procedencia: 3%QS, 10% PVA, relación 1:1</p>	<p>Las fibras presentan irregularidades en su morfología y acumulación de material de diferentes tamaños y longitudes, con baja presencia de bulbos lo largo de la superficie</p>
	<p>Muestra: AG-310 Tipo de inyector: Aguja Potencial eléctrico: 20kV Flujo: 0.2 mL/min Distancia: 20 cm Tiempo: 60 min Humedad: 25% Solución de procedencia: 3% QS, 10% PVA, relación 1:1</p>	<p>Las fibras presentan bulbos de 462 a 2670 nm de ancho por 1042 a 2711 nm de largo distribuidos de manera uniforme sobre toda superficie de la fibra; diámetro medio de 224 nm en un intervalo de 108 nm a 353 nm; sin acumulación de material</p>
	<p>Muestra: AH-310 Tipo de inyector: Aguja Potencial eléctrico: 25kV Flujo: 0.2 mL/min Distancia: 20 cm Tiempo: 60 min Humedad: 25% Solución de procedencia: 3% QS, 10% PVA, relación 1:1</p>	<p>Las fibras presentan morfología cilíndrica con diámetro medio de 230 nm en un intervalo de 115 nm a 318 nm. Sin evidencia de bulbos y una aislada presencia de material acumulado.</p>
	<p>Muestra: AI-310 Tipo de inyector: Aguja Potencial eléctrico: 20kV Flujo: 0.2 mL/min Distancia: 15 cm Tiempo: 60 min Humedad: 25% Solución de procedencia: 3% QS, 10% PVA, relación 1:1</p>	<p>Las fibras presentan una morfología cilíndrica uniforme sin presencia de bulbos; con diámetro medio de 212.9 nm en un intervalo de 114 a 302 nm.</p>

De la Tabla anterior se puede concluir que el mejor método de inyección de muestra es el método de aguja (Tabla 16, figura a), debido a la obtención de fibras de diámetros homogéneos, sin presencia de bulbos ni de acumulación de material a lo largo de la superficie de estudio, en comparación con la inyección por el método de carrusel (Tabla 16, figura b).

Si bien es cierto que el tiempo de electrohilado es menor en el método de carrusel debido a la formación de múltiples gotas sobre la superficie de este, representa una desventaja por la variabilidad del tamaño de estas y su decremento durante el transcurso del proceso de electrohilado, lo que ocasiona que el diámetro de las fibras presente alta variabilidad y acumulación de material; es por lo que se decidió utilizar para las pruebas subsecuentes el inyector de aguja. Los efectos del inyector de tipo carrusel pueden observarse en las micrografías de las muestras RA-010 y RD-310 (Tabla 16, figuras b y d), mientras que los tipos de inyectores utilizados se muestran en la Figura 19.

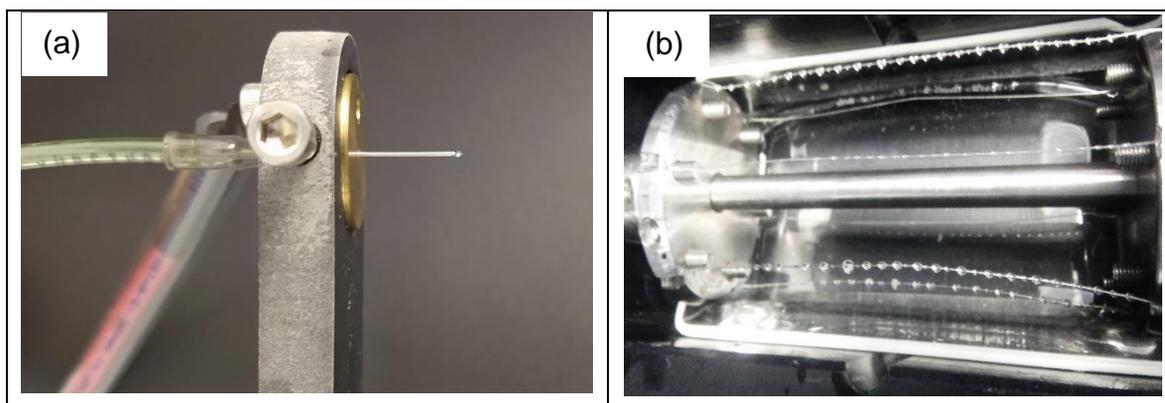


Figura 19. Inyector de aguja (a) y carrusel (b) en el electrohilado de nanofibras.

Por otro lado, puede observarse la presencia de bulbos (cuentas), los cuales son defectos que disminuyen la superficie por unidad de área de fibra (ver fibras AC-310 y AG-310). Estos son defectos comunes que pueden atribuirse a la tensión superficial, que convierte el cono de Taylor en gotas; a la repulsión de las cargas electrostáticas en la superficie del jet del polímero; y a potenciales eléctricos bajos, propiciando la acumulación de material en la salida del inyector al no contrarrestar la tensión superficial del polímero (Rebia, Rozet, Tamada, & Tanaka, 2018). Es por lo que, aumentar el potencial eléctrico favorece la repulsión de las cargas electrostáticas a lo largo del cono

de Taylor y la superficie del jet ayudando a la formación de fibras homogéneas de diámetros menores, esto se puede observar en las fibras AH-310 y AI-310.

De los resultados anteriores puede observarse que la fibra que presenta la mejor morfología es la AI-310, esto es sin presencia de bulbos, fibras uniformes y diámetro pequeño; razón por la cual se utilizará en la inmovilización de enzimas. Resultados similares fueron reportados por Esmaeili & Beni (2014) para fibras de QS-PVA con diámetro de 214 nm, por su parte Seino et al. (2018) obtuvieron diámetros de 230 nm para fibras de PVA y Zeng et al. (2016) reportaron diámetros de fibra en un intervalo de 70 – 200 nm para nanofibras con diferente composición de QS-PVA.

De forma análoga a la determinación del diámetro de cada fibra, se midió y estimo con ayuda del software de procesamiento de imágenes, el área superficial de la fibra AI-310 así como de sus repeticiones, el área aparente se situó en $96.6 \pm 19.1 \text{ m}^2/\text{g}$. Este bajo valor de área superficial se debe a la forma de estimación de la superficie por procesamiento de imagen, ya que solo es posible medir las capas superficiales de fibras en la micrografía, dejando de lado las capas más internas, por lo cual es recomendable realizar un estudio utilizando isoterma de adsorción que permitirán cuantificar de mejor manera el área de las NFsQ. Utilizando isoterma de adsorción de níquel y cobalto Esmaeili & Beni (2014) reportaron valores de área superficial de $214 \text{ m}^2/\text{g}$ para nanofibras de QS-PVA.

Es conveniente realizar estudios detallados de los parámetros de electrohilado con el fin de optimizar y conocer la contribución de cada uno de ellos en la generación de nanofibras de QS-PVA. Finalmente, deberán realizarse pruebas que permitan conocer de forma adecuada el área superficial de las fibras, pues la estimación por análisis digital de imagen no permite conocer el área efectiva de las NFsQ.

8.4.2. Caracterización de las NFsQ

8.4.2.1. *Espectroscopia de infrarrojo*

En la figura 20 se ilustran los espectros infrarrojos obtenidos para el (a) QS, (b) PVA y (c) NFsQ. En el espectro correspondiente a PVA (b) se pueden apreciar bandas

características de este compuesto, las cuales son atribuidas a las vibraciones por tensión de los enlaces -OH y -CH_2 a los 3322 cm^{-1} y 2915 cm^{-1} , respectivamente (Bonilla, Fortunati, Atarés, Chiralt, & Kenny, 2014), además de las bandas pertenecientes a las vibraciones por flexión de los enlaces -OH a los 1428 cm^{-1} , C-H a los 1321 cm^{-1} y C-O-H a los 1088 cm^{-1} (Rebia et al., 2018).

Por su parte, el espectro del QS (a) presenta las bandas características de los grupos funcionales de la molécula de quitosano en la región de los 650 a 4000 cm^{-1} . La banda en la zona de los 3000 a 3600 cm^{-1} se atribuye a las vibraciones por tensión de los enlaces O-H y N-H , la forma ancha de esta banda se debe a la presencia de enlaces por puentes de hidrógeno presentes en el biopolímero (Branca et al., 2016), la banda a los 2870 cm^{-1} es debida a las vibraciones por tensión asimétrica del enlace C-H , mientras que las bandas correspondientes a los grupos amino pueden ser asignadas a los 1644 cm^{-1} para las vibraciones por flexión del enlace -NH_2 (Pawlak & Mucha, 2003) y a los 1582 cm^{-1} para la tensión del enlace N-H (Bonilla et al., 2014), por su parte la banda correspondiente a los 1419 cm^{-1} es debida a la tensión del enlace C-CH_2 , las bandas a los 1319 cm^{-1} (amida III) y 1377 cm^{-1} se atribuyen a las vibraciones por flexión de la unidad glucosamina del biopolímero (Abdel-Fattah, Jiang, El-Bassyouni, & Laurencin, 2007), también se aprecian las bandas por tensión asimétrica a 1144 cm^{-1} del grupo C-O-C en la molécula, así como las vibraciones del anillo piranósico a 1092 cm^{-1} que involucran las vibraciones del enlace C-O (Mauricio-Sánchez, Salazar, Luna-Bárceñas, & Mendoza-Galván, 2018), finalmente se puede apreciar una banda de absorción a los 893 cm^{-1} correspondiente a las vibraciones del grupo $\text{CH}_3\text{CO-}$ (Corazzari et al., 2015; Pawlak & Mucha, 2003).

Finalmente el espectro correspondiente a NFsQ muestra ligeras diferencias con respecto al espectro de PVA, puede distinguirse la presencia de algunos de los grupos funcionales del QS en las bandas correspondientes a los grupos amino, esto es a los 1644 cm^{-1} y 1582 cm^{-1} asignados a las vibraciones por flexión y tensión de los enlaces -NH_2 y N-H respectivamente (Bonilla et al., 2014; Pawlak & Mucha, 2003); así como a los 893 cm^{-1} para las vibraciones del grupo $\text{CH}_3\text{CO-}$ (Corazzari et al., 2015). Además, se puede apreciar la disminución de la intensidad de la banda correspondiente a la tensión

del enlace $-\text{CH}_2$ (2915 cm^{-1}) en comparación con el espectro de PVA puro, lo cual de acuerdo con Bonilla et al. (2014), puede adjudicarse a la presencia de interacciones específicas como puentes de hidrógeno entre los grupos funcionales de ambos polímeros, afectando así las intensidades de banda y generando el enmascaramiento de los grupos funcionales característicos de cada uno.

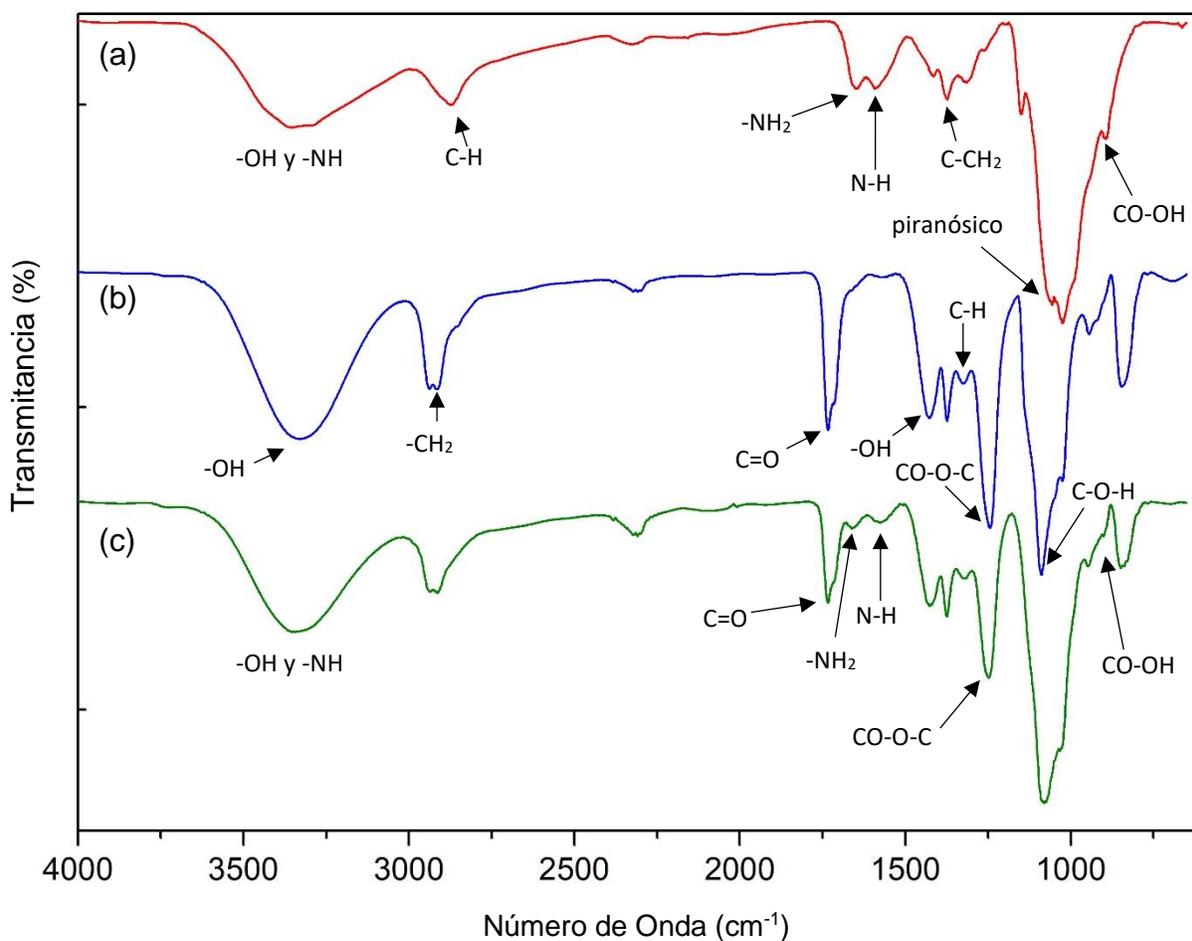


Figura 20. Espectro infrarrojo de (a) QS, (b) PVA y (c) NFsQ (Elaboración propia, 2018).

8.4.2.2. Calorimetría de Barrido Diferencial

Los ensayos térmicos se realizaron de acuerdo con la metodología descrita en el apartado 7.3.1.8.1., En la figura 21 se presentan los resultados de estas pruebas para los polímeros PVA y QS puros, así como la NFsQ que presentó la mejor distribución y morfología.

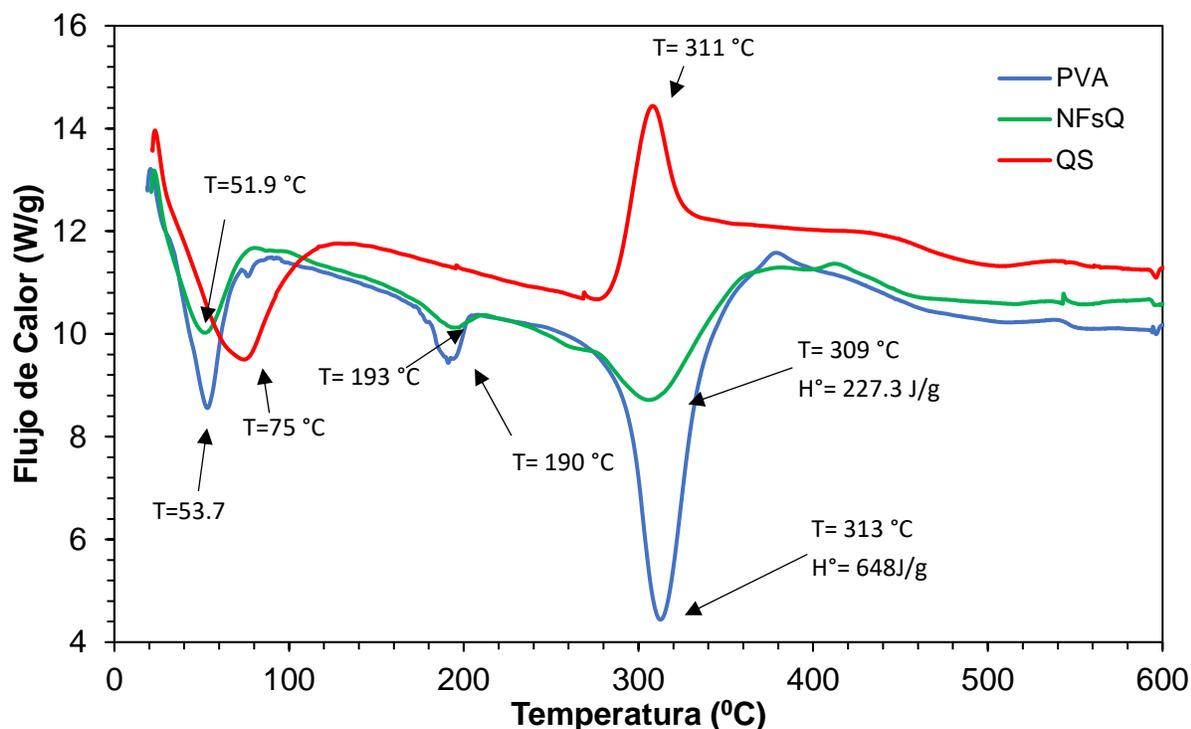


Figura 21. Termogramas DSC para QS (rojo), PVA (azul) y NFsQ (verde) con rampa de calentamiento 10 °C/min y atmosfera de nitrógeno (Elaboración propia, 2018).

En los termogramas obtenidos en la caracterización DSC se puede observar que el QS (verde) presenta tres eventos térmicos principales, el primero de ellos ocurre entre los 20-220 °C, observándose un poco endotérmico alrededor de los 75 °C, lo cual de acuerdo con Kaya et al., (2016) se debe al agua contenida en el interior del polímero la cual actúa como plastificante al formar enlaces por puentes de hidrógeno con los grupos hidroxilo y amino presentes en el polímero, permitiendo la movilidad de las cadenas poliméricas.

Un segundo evento térmico ocurre entre los 220 °C y 380 °C con un poco exotérmico alrededor de los 311 °C, el cual puede ser atribuido a la degradación de la estructura sacárida de la molécula, incluyendo la deshidratación del anillo piranósico y la descomposición de las unidades acetiladas y desacetiladas a lo largo de la cadena polimérica.

Por su parte, el termograma correspondiente al PVA (azul) muestra un pico endotérmico a los 53.7 °C lo cual está relacionado con la temperatura de transición vítrea (T_g). Un segundo evento térmico se presentó a los 190 °C, este puede ser asignado a la

temperatura de fusión del PVA y finalmente un tercer pico endotérmico a los 313 °C lo cual se atribuye a la degradación del PVA.

De manera análoga a los espectros FT-IR, los termogramas correspondientes a NFsQ presenta características de los polímeros puros. El valor de la Tg de la mezcla presentó un ligero aumento con respecto al PVA, esto debido a la presencia de QS y sus interacciones con el PVA a través de la formación de enlaces por puentes de hidrógeno y el posible aumento del peso molecular medio de la fibra (Bonilla et al., 2014). Así mismo, puede notarse un decremento en la temperatura de fusión del PVA debido a la degradación exotérmica del QS la cual ocurre a la misma temperatura. Los resultados de esta prueba sumados a la espectroscopia FTIR son evidencia de la presencia de una mezcla de QS y PVA en las nanofibras obtenidas.

8.5. Caracterización del sistema NFsQ-CPO

La inmovilización de enzimas es una estrategia empleada comúnmente para incrementar la estabilidad de estas, permite su reutilización, además de facilitar la separación de los productos obtenidos del medio de reacción y como resultado de su uso los procesos enzimáticos son en consecuencia más económicos (Gupta, Kaloti, Kapoor, & Solanki, 2011; Andres Illanes, 2008; Romo et al., 2012).

8.5.1. Morfología

Es por las razones anteriormente expuestas que, la CPO fue inmovilizada en las nanofibras. La inmovilización se realizó de acuerdo con lo descrito en el apartado 7.3.1.9. y se eligieron aquellas nanofibras que presentaron una morfología cilíndrica uniforme y sin presencia de bulbos que pudieran disminuir el área superficial del nanomaterial, lo que reduciría la cantidad de biocatalizador inmovilizado, además de reducir la variabilidad de los datos.

En la Figura 20 se muestran las micrografías correspondientes a las diferentes etapas de inmovilización (reticulación e inmovilización), en ella se muestra que las fibras

reticuladas no presentan cambios morfológicos importantes (figura 22a y 22c) en comparación con las fibras electrohiladas sin modificar (ver Tabla 15, Figura g).

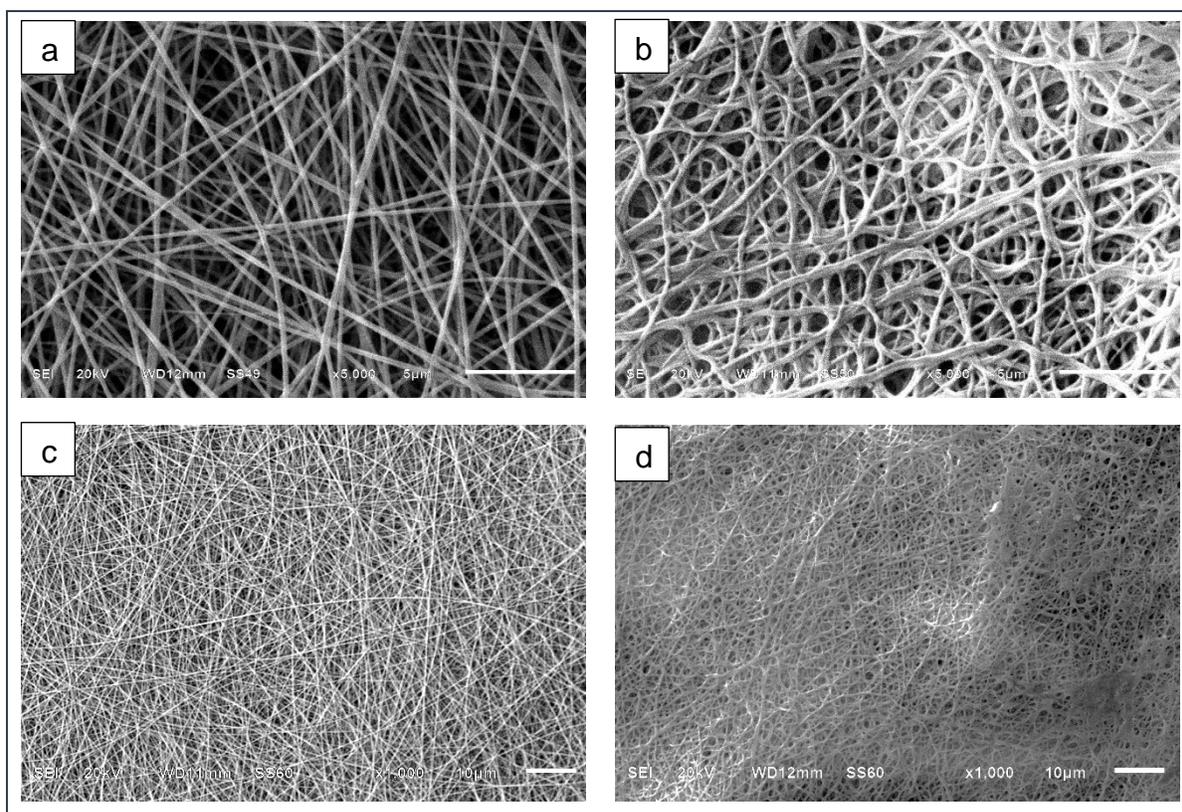


Figura 22. Micrografías SEM a 5000X (arriba) y 1000X (abajo), para nanofibras de quitosano activadas con glutaraldehído (a) y (c) e inmovilizadas con CPO (b) y (d). (Elaboración propia, 2019)

Asimismo, puede observarse que el cambio más importante registrado ocurre en la inmovilización enzimática ya que la estructura morfológica de las fibras muestra ser cilíndrica irregular y entrecruzada (Figura 22b) en comparación con las nanofibras activadas (Figura 22a), además se observa la presencia del biocatalizador en forma de gotas irregulares presentes a lo largo de la superficie del material (Figura 22d).

Por otra parte, el diámetro de las NFsQ-CPO calculado por análisis digital de imagen incrementa de 213 nm a 245 nm, mientras que la superficie del material se reduce un 14% al estar hidratadas y en contacto con el biocatalizador pasando de 1 cm² a 0.864 cm² en promedio, por su parte el análisis digital de imagen reveló una disminución del área superficial de las NFsQ-CPO de 96.6 m²/g a 68.7 m²/g, lo cual representa una reducción de aproximadamente 28.8%. Esta reducción en el cálculo del área superficial

puede explicarse debido a la presencia de CPO sobre la superficie del material, lo cual además de disminuir el área de contacto física también reduce la superficie visible de las fibras al encontrarse cubiertas por el biocatalizador, lo cual puede llevar a subestimar el área calculada; debido a esta limitación es que se recomienda realizar isotermas de adsorción que permitan conocer el área real de este material.

8.5.2. Adsorción

Para conocer la cantidad de TBBPA que puede ser removido sin ser degradado por las NFsQ-CPO se realizaron pruebas de adsorción que permitieran cuantificarlo. Estas pruebas se realizaron conforme a lo establecido en el apartado 7.3.1.10.

Los resultados mostraron que después de 30 minutos de contacto, las NFsQ-CPO solo removieron el 1.6% del TBBPA inicial, este valor incrementa a 2.5% después de 120 minutos de contacto; por lo cual se puede considerar a este fenómeno físico como despreciable al no contribuir de manera significativa ($p > 0.05$) a la remoción del TBBPA presente.

8.5.3. Actividad enzimática

La determinación de la actividad enzimática de las NFsQ-CPO se cuantificó de acuerdo con lo establecido en el apartado 7.3.1.9. utilizando acetato de tionina como sustrato. Los resultados de estas pruebas revelaron un rendimiento de inmovilización del 14.8% de la CPO dosificada, esto es, 340.4 nmoles/cm².

Este rendimiento de inmovilización fue comparado con el rendimiento de otros materiales nano y micro estructurados haciendo uso de diferentes enzimas; este proceso de inmovilización se realizó de acuerdo con lo reportado por Zimmermann *et al.* (2011). Las pruebas fueron realizadas en el laboratorio de Biotecnología Ambiental perteneciente al departamento de Ingeniería Química de la Universidad de Santiago de Compostela, España. El resumen de estos ensayos se presentan en la Tabla 17.

Tabla 17. Comparación del rendimiento de inmovilización de enzimas en diferentes soportes (Elaboración propia, 2018).

Enzima / Soporte	Rendimiento Máximo (%)		
	$\mu\text{P}'\text{s}^*$	$\text{NP}'\text{s}^\dagger$	NFsQ
<i>Lacasa</i>	98.8	114	89.9
<i>Manganeso Peroxidasa</i>	31.7	37.5	64.6
<i>Galactosa Oxidasa</i>	38.4	60.3	17.5
<i>Aril Alcohol Oxidasa</i>	1.2	3.1	10.5
<i>Peroxidasa Inespecífica</i>	122.4	161.8	90.9
<i>Cloroperoxidasa</i>	SD	SD	14.8

* Micropartículas de sílice

† Nanopartículas de sílice

Como puede observarse en la tabla anterior, el rendimiento de inmovilización es variado en función del soporte y enzima utilizados; sin embargo, cabe destacar que el rendimiento en la inmovilización para otras enzimas como Lacasa, Manganeso Peroxidasa y Peroxidasa Inespecífica es cercano o incluso mayor que los soportes de sílice utilizados comúnmente en la inmovilización de enzimas. Lo cual evidencia el alto potencial de aplicación y uso de las NFsQ en la inmovilización de biocatalizadores.

8.6. Oxidación enzimática del TBBPA mediante NFsQ-CPO

Una vez caracterizadas las NFsQ-CPO, se ensayó la capacidad oxidativa de sistema sobre el TBBPA, esto de acuerdo con la metodología descrita en el apartado 7.3.1.1. En la Figura 23 se muestra el cromatograma correspondiente a la reacción de oxidación enzimática del TBBPA.

Se puede observar que el tiempo de retención se ubicó a los 8.47 minutos para este compuesto, además de una clara disminución del área, lo cual es indicativo de la transformación del sustrato por la enzima, que para este caso es equivalente a una conversión del 54.93% en los 30 primeros minutos de reacción, es decir, una disminución de la velocidad de transformación del 41.25%; sin embargo este valor de remoción se incrementó a 89.27% después de 90 minutos de reacción, con un valor k de 0.076 min^{-1} , lo que representa 36% menos que la enzima libre. Resultados de conversión similares fueron reportados por Xu et al. (2015) con el uso de nanofibras de nitrocelulosa, logrando

una conversión del 95.9% en 180 minutos para este RF, lo cual representa el doble de tiempo en la remoción del TBBPA.

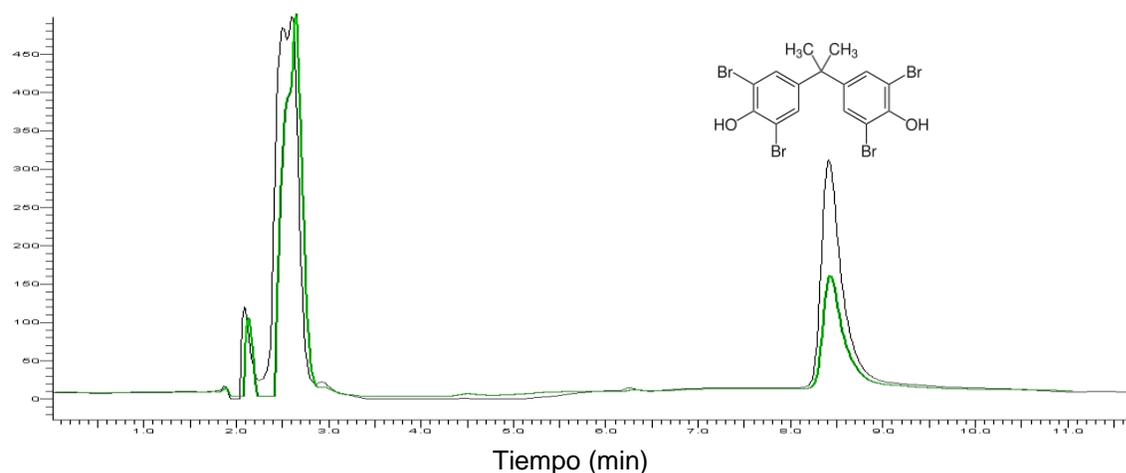


Figura 23. Oxidación enzimática del TBBPA por NFsQ-CPO antes (negro) y después (verde) de 30 minutos de oxidación enzimática (Elaboración propia, 2019).

Por otra parte, la pérdida de actividad enzimática de los biocatalizadores ha sido ampliamente reportada y puede atribuirse a la técnica de inmovilización, debido a algún cambio conformacional que diera lugar a una forma desactivada, a que la unión al soporte impida el paso del sustrato al centro activo de la enzima o a la desnaturalización de esta última (Miguel Arroyo, 1998; Bilal et al., 2016; Díaz Ramos, 2012; Zimmermann et al., 2011).

Sin embargo, a pesar de la pérdida de actividad del sistema inmovilizado, los resultados obtenidos en la degradación del TBBPA en esta investigación muestra que, tanto el porcentaje de biotransformación (aproximadamente 90%) como el tiempo para alcanzarla, se encuentra dentro de lo reportado por otras investigaciones, las cuales hacen uso de métodos químicos o biológicos; como lo reportado por Xu et al., (2015) al utilizar nanofibras de nitrocelulosa para la inmovilización de la enzima HRP, logrando la conversión del 93.9% de TBBPA en 3 horas; mientras que Fan et al., (2017) emplearon biofilms de *Trichococcus*, *Propioniciclav*a y *Azoarcus* logrando una conversión del 100% en 48 h; por su parte Sun et al., (2014) lograron la remoción del 60.8% de TBBPA en 20 días al usar humedales con las especies *Oryza sativa* y *Phragmites australis*; por su parte Bao & Niu, (2015) degradaron del 72.4% al 99.9% al irradiar un muestras modelo de TBBPA con luz solar simulada (lámpara de Xenón 500W) durante 3 h; o el uso de

nanotubos de carbono/ Fe_2O_3 irradiados con luz UV reportados por Wu et al., (2019) en la conversión del 60% del TBBPA en 30 min.

Si bien es cierto que la ventaja de un tratamiento químico o de oxidación avanzada puede conducir a la mineralización de los contaminantes, presentan una desventaja en el consumo energético o el tiempo de operación requerido para lograr dicha transformación; mientras que la técnica propuesta en esta investigación puede lograr porcentajes de conversión similares en menor tiempo (90 min), además de contribuir a disminución del carácter contaminante, tóxico y recalcitrante del TBBPA.

Por otra parte, la caracterización de las aguas residuales permitió evaluar la eficiencia biocatalítica en la transformación del retardador de flama TBBPA. Los resultados de estas pruebas evidencian que la eficiencia en la conversión del TBBPA por las nanofibras biocatalíticas no se ve afectada en gran medida por la presencia de sales en forma de nitratos, fosfatos y sulfatos; ni por la presencia de grandes concentraciones de materia orgánica e inorgánica en el efluente (reflejados por la DBO y DQO) que pudieran causar algún tipo de inhibición del biocatalizador inmovilizado o la desnaturalización de este; ya que la conversión de este compuesto en 30 minutos de reacción pasó del 94.8% en muestras modelo a 90.2% en aguas residuales tratadas (disminución del 4.6%) para el biocatalizador sin inmovilizar; y del 54.9% a 53.5% para el biocatalizador inmovilizado en muestras modelo y agua residual tratada respectivamente (disminución del 1.4%). Sin embargo, se debe mencionar que el pH de las aguas residuales utilizadas fue ajustado a 3.0 para asegurar la máxima actividad enzimática.

Debido a esta limitante es que fue necesario realizar pruebas de estabilidad operacional al sistema inmovilizado, evaluando su actividad y eficiencia en la conversión del RF a pH superior a 3.0 y cercanos al pH del efluente en la descarga de la PTAR

8.7. Estabilidad operacional del sistema NFsQ-CPO

La estabilidad operacional del sistema inmovilizado permite explorar la aplicación práctica del biocatalizador. Estudios recientes han demostrado que la inmovilización con

QS y otros materias como el PVA y derivados de sílice pueden mejorar la estabilidad de las peroxidasas al proporcionar un microambiente que protege a la enzima de los cambios de pH que ocurren en el avance de la reacción (Aburto et al., 2005; Romo et al., 2012; Xu et al., 2013). Aunado a esto, un sistema biocatalítico inmovilizado adecuado para su uso en biocatálisis ambiental deberá ser capaz de ser estable a condiciones fluctuantes de pH, temperatura y complejidad de la matriz tratada

En el caso de la CPO, dos de los factores determinantes en su eventual aplicación industrial son su estrecho perfil de pH en el que presenta actividad, así como la dificultad de reutilizar la enzima en diferentes ciclos de tratamiento. Es por estas razones que se realizaron pruebas que permitirán conocer los límites máximos de operación del biocatalizador inmovilizado para su potencial aplicación en diferentes muestras ambientales.

8.7.1. Estabilidad al pH.

Los resultados para las pruebas de estabilidad al pH presentado en la Figura 24 muestra que la inmovilización del CPO en nanofibras amplía el rango de pH hasta un máximo de 7, mostrando actividad casi de forma constante en el intervalo de pH de 3 - 6 y manteniendo a pH 7 el 19.57% de la actividad original exhibida a pH 3; mientras que su contraparte sin inmovilizar presenta una pérdida del 97.86% a pH 6.0.

Este resultado puede explicarse debido a la formación de un microambiente protector debido a la naturaleza biocompatible de los polímeros que forman la nanoestructura, permitiendo a la enzima permanecer activa a pH superiores. (M. Arroyo, Acebal, & de la Mata, 2017; del Monte-Martínez et al., 2013; Wang, Wan, Liu, Huang, & Xu, 2009). Resultados similares fueron obtenidos en una investigación anterior con el uso de soportes de quitosano en la inmovilización de CPO para la degradación de contaminantes farmacéuticos, logrando retención de la actividad en casi el 100% a pH 5.0 mientras que la enzima sin inmovilizar presentó 60% de dicha actividad (García-Zamora et al., 2018).

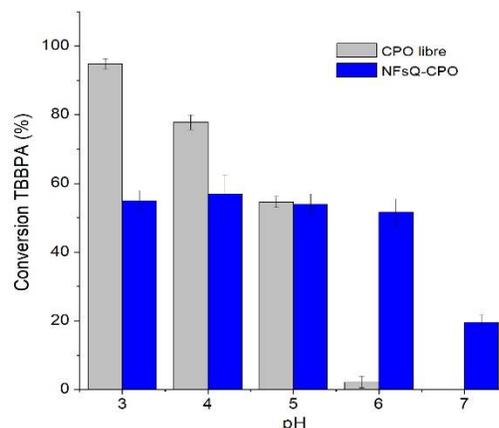


Figura 24. Comparación de la estabilidad al pH de la enzima libre e inmovilizada (Elaboración propia, 2019)

El hecho de que la inmovilización de CPO en NFsQ permita su actividad a un pH superior a 5, pH al cual la enzima se desnatura irreversiblemente (Aburto et al., 2005; Valderrama, Ayala, & Vazquez-duhalt, 2002), incrementa el potencial de aplicación del sistema NFsQ-CPO en diferentes aplicaciones, incluyendo la posibilidad de su implementación en el tratamiento efluentes de las PTAR con mínimos ajustes de ser necesario, ya estas deben de descargar efluentes con pH 6 – 8 (NMX-AA-028-SCFI-2001), lo cual representa un gran avance para su aplicación en biocatálisis ambiental.

8.7.2. Reusabilidad.

Como segunda prueba de estabilidad del sistema NFsQ-CPO, se determinó el número de ciclos que es posible reutilizar el biocatalizador inmovilizado debido a que este factor es esencial para la aplicación práctica del mismo. En la Figura 5 se muestran los resultados de estas pruebas de estabilidad para el sistema NFsQ-CPO.

En dicha figura se puede observar que, este sistema podría reutilizarse durante un máximo de tres ciclos de reacción con un porcentaje de conversión superior al 65%, pues a partir del cuarto ciclo de reacción este porcentaje de conversión disminuye aproximadamente un 27% por cada ciclo posterior, lo cual representa una pérdida del 82.7% en el quinto ciclo de reuso, mientras que el sexto ciclo de uso, el sistema solo logra degradar menos del 1% del TBBPA presente, lo cual indica la desactivación del biocatalizador inmovilizado.

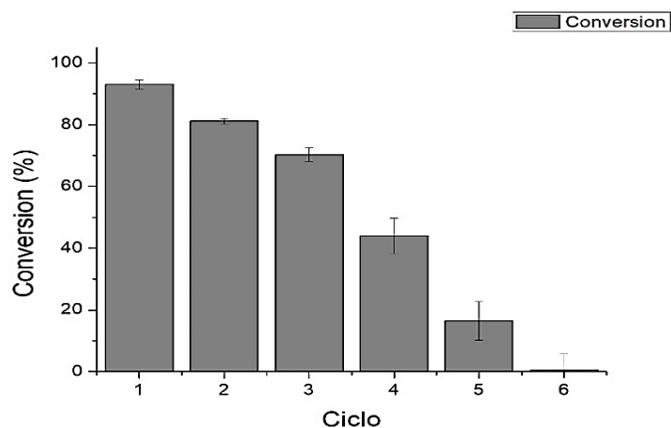


Figura 25. Reusabilidad de las NFsQ-CPO para la oxidación de TBBPA (Elaboración propia, 2019).

Resultados similares fueron reportados en una investigación anterior para la inmovilización de CPO en macroesferas de quitosano, logrando el reuso de dicho biocatalizador durante tres ciclos y su posterior desactivación en el cuarto ciclo de oxidación de ketorolaco (García-Zamora et al., 2018). La pérdida de actividad de la actividad peroxidasa ha sido reportada por la inactivación ocasionada por el H_2O_2 conocida como inactivación suicida, lo cual explica la desactivación de las NFsQ-CPO (Hidalgo Cuadrado, 2011; Valderrama et al., 2002).

8.7.3. Degradación de TBBPA en muestras ambientales

Finalmente, se probó la estabilidad del sistema NFsQ-CPO frente a muestras ambientales de diferente origen (tres muestras de agua superficial, una muestra de agua subterránea y agua residual tratada de dos PTAR) las cuales fueron fortificadas con 10 μM de TBBPA y se adicionaron concentraciones de H_2O_2 y KCl equivalentes a las muestras modelo, esto de acuerdo con lo establecido en la sección 7.3.1.1. Los resultados de estas pruebas se muestran en la Tabla 18. Estos muestran que la conversión promedio a los 30 minutos fue del 54%, mientras que a los 90 minutos se logró una conversión promedio del 89%.

Tabla 18. Comparación de la capacidad oxidativa de las NFsQ-CPO para TBBPA en muestras modelo y ambientales de diferente origen (Elaboración propia, 2019)

Origen de la muestra	Degradación de TBBPA 30 min (%)	Degradación de TBBPA 90 min (%)
Muestra modelo	54.93	89.27
Agua destilada	52.87	92.46
PTAR Izúcar Mataros	53.50	87.11
PTAR, C.U. BUAP [‡]	58.62	95.23
Laguna C.U. BUAP [‡]	53.87	91.39
Río Nexapa*	45.68	79.35
Río Chapa Chapa [†]	57.31	86.75
Subterránea de pozo [†]	54.86	90.07

Muestras ajustadas a pH: 3.0

Tomada en: *Izúcar de Matamoros, Puebla; [‡]Puebla, Puebla; [†]Misantla, Veracruz.

Lo anterior evidencia que el sistema inmovilizado mantiene la capacidad de biodegradar al TBBPA en las diferentes matrices de agua, incluidos los efluentes tratados de las dos PTAR, a pesar de tener condiciones ambientales y características fisicoquímicas diferentes (ver Tabla 19), lo que sugiere que la técnica de degradación propuesta en esta investigación es robusta y de potencial aplicación en el tratamiento de efluentes de aguas residuales tratadas y en otras áreas como la industria de alimentos o farmacéutica, en donde la calidad del agua es un requisito muy importante en sus procesos productivos.

Tabla 19. Caracterización fisicoquímica parcial de muestras ambientales de agua

Parámetro	Agua subterránea*	Agua Superficial			Agua residual tratada	
		Laguna	Río A	Río B	PTAR-A	PTAR-B
pH	6.55	8.84	7.42	7.54	7.52	7.27
DBO (mg O ₂ /L)	2.0	3.0	20.0	5.5	160.0	37.0
DQO (mg O ₂ /L)	5.0	8.5	832.0	16.5	781.5	104.0
SDT (m/L)	652.0	452.0	681.0	636.0	1120.0	1349.0
Conductividad (μS/cm)	921.0	593.0	1313.0	872.0	2260.0	1423.0
Cloro libre (mg/L)	0.09	0.05	0.0	0.165	0.14	0.05
NO ₃ ¹⁻ (mg/L)	4.05	27.45	0.0	39.70	80.0	268.00
PO ₄ ³⁻ (mg/L)	0.68	1.78	3.5	0.51	45.0	106.50
SO ₄ ²⁻ (mg/L)	96.0	74.0	175.0	137.0	95.0	97.0
Mg ²⁺ (mg/L)	10.0	15.0	35.0	20.0	65.0	15.0
Ca ²⁺ (mg/L)	0.0	103.5	160.0	10.0	200.0	0.0
Fe ³⁺ (μg/L)	66.0	18.0	0.375	36.0	1310.0	--

*Muestra tomada en Misantla, Veracruz; **Río A:** Nexapa, Izúcar de Matamoros; **Río B:** Chapa-Chapa, Misantla, Veracruz; **PTAR-A:** Izúcar de Matamoros; **PTAR-B y laguna:** BUAP-CU

8.8. Marco DESSIN en la implementación de la propuesta biotecnológica

Un problema común con las intervenciones o respuestas tecnológicas para reducir la problemática ambiental, como el propuesto en esta investigación, es que los esfuerzos son dirigidos generalmente contra las causas proximales de problemas específicos, dejando de lado los factores más distales o estructurales y sobre todo la articulación entre ellos. Este enfoque proximal tiene su fundamento en un enfoque individual de etiología y epidemiología que enfatiza los factores de riesgo inmediatos y a corto plazo, dejando de lado los riesgos a mediano y largo plazo. Es por lo que se hace necesario la incorporación de los procesos más distales en los análisis y diseños de las intervenciones o respuestas, así como en las interacciones entre los elementos causales, lo cual podría resultar en respuestas más efectivas y en ocasiones más sostenibles.

Por ello en esta investigación, se propone una serie de respuestas dirigidas a disminuir los efectos de la contaminación del Río Nexapa (el Estado) provocado por la presencia del COP's y las actividades antropogénicas en Izúcar de Matamoros (Presiones y Fuerzas motrices del sistema respectivamente), como parte complementaria a la propuesta biotecnológica desarrollada, para la mejora del tratamiento de COP's en la PTAR Izúcar de Matamoros, tomando como modelo él TBBPA.

La respuesta tecnológica que se propone para PTAR Izúcar de Matamoros se basa en la oxidación enzimática, un bioproceso considerado sustentable; pero que, sin embargo, es normalmente abordado desde la perspectiva disciplinar de biotecnología, o ingeniería biológica. Para dar un paso adelante en la solución del problema, en este trabajo se analiza la eficiencia de la tecnología, y se evalúan los efectos de su implementación mediante el marco de referencia DESSIN (Demonstrate Ecosystem Services Enabling Innovation in the Water Sector), desarrollado por Anzaldua et al., (2018).

A continuación, se describe los resultados del desarrollo de la propuesta tecnológica con base al marco de referencia DESSIN que permita analizar algunos aspectos de los efectos de la intervención tecnológica en la PTAR Izúcar de Matamoros.

Las tablas 20-22 resumen la información para el sistema de acuerdo con las etapas de la evaluación

Tabla 20. Capacidades de la intervención tecnológica propuesta para el mejoramiento de la calidad del agua de la PTAR Izúcar de Matamoros (elaboración propia, 2019)

Respuesta	Capacidad esperada	Descripción cualitativa	Descripción cuantitativa
Implementación de tecnología de oxidación enzimática avanzada (nanofibras biocatalíticas) como proceso terciario en la PTAR	Reducción de la concentración de contaminantes orgánicos persistentes	Eliminación de compuestos orgánicos persistentes de tipo aromático provenientes de las descargas municipales como plaguicidas, detergentes, fármacos, productos de cuidado personal, etc.	Disminución del 90% de la concentración de compuestos aromáticos
	Potencial reducción de contaminación microbiológica	Eliminación de los coliformes totales y otros microorganismos patógenos	Potencial eliminación de 90% de microorganismos patógenos (Grover, Borkar, Dinu, Kane, & Dordick, 2012); (Renirie et al., 2008); (Sampaio et al., 2016)
	Reducción de olores desagradables de las descargas	Eliminación por oxidación de compuestos aromáticos volátiles	Eliminación del 60-90% de compuestos volátiles (De la Cruz, García, & Ayala, 2015)

Tabla 21. Efectos de la intervención propuesta en las Presiones y Estado del Ecosistema

Intervención propuesta	Capacidad	
	Efecto en las Presiones	Efecto en el Estado
Implementación de tecnología de oxidación enzimática en PTAR	Aumento en la calidad de agua de las descargas municipales	Calidad química (Reducción de la concentración de COP's) Calidad biológica (Reducción en contaminación microbiológica) Calidad física (Reducción de malos olores)
	Incremento en el uso de agua de buena calidad para riego agrícola	Calidad química (Reducción de la concentración de COP's) Calidad biológica (Reducción en contaminación microbiológica) Calidad física (Reducción de malos olores)

Tabla 22. Lista de servicios ecosistémicos relevantes para el caso asociada a los parámetros afectados del estado

Parámetro del Estado influenciado por la respuesta	Sección (SE)	División (CICES)	Grupo (CICES)	Clase SE (CICES)
Calidad química	Regulación y sostenimiento (Abiótico)	Transformación de insumos bioquímicos o físicos a los ecosistemas.	Mediación de desechos o sustancias tóxicas de origen antropogénico por procesos vivos.	Biorremediación por organismos, algas, plantas y animales
Calidad física	Regulación y sostenimiento (Abiótico)	Transformación de insumos bioquímicos o físicos a los ecosistemas.	Mediación de inconveniencias de origen antropogénico.	Reducción de olores
Calidad química	Regulación y sostenimiento (Biótico)	Regulación de condiciones físicas, químicas y biológicas.	Mantenimiento del ciclo de vida, protección del hábitat y del acervo genético	Mantenimiento de poblaciones y hábitats (incluida la protección de la reserva genética)
Calidad química, biológica y física	Aprovisionamiento (Abiótico)	Agua	Agua superficial utilizada para nutrición, materiales o energía.	El agua superficial utilizada como material (no potable)

Como se puede observar de las tablas anteriores, la implementación de la propuesta biotecnológica supone una serie de impactos positivos en la calidad del agua residual tratada, que va desde la disminución de COP's, microorganismos y eliminación de olores, contribuyendo a la mejora de la calidad del agua del Río Nexapa y el uso seguro de esta agua para riego agrícola.

IX. CONCLUSIONES

Son los resultados anteriormente mostrados los que permiten concluir que la propuesta biotecnológica desarrollada en este proyecto de investigación es potencialmente aplicable en la mitigación de la contaminación por RF y otros COP´s al ser una técnica ambientalmente segura y de fácil aplicación. Sin embargo, será necesario realizar estudios que permitan ampliar la información aquí mostrada para llevar a cabo su escalamiento e implementación. Dentro de los logros destacables se puede mencionar que:

- Se logró la biotransformación del TBBPA por CPO alcanzando porcentajes de conversión del 93.5% a los 30 min de reacción en muestras modelo para la enzima libre, mientras que para el sistema inmovilizado propuesto se obtuvieron porcentajes de remoción promedio del 89% en 90 minutos para aguas de diferente origen y características fisicoquímicas, permitiendo el reúso del biocatalizador hasta en 5 ocasiones y su aplicación a intervalos de pH 3 - 7 conservando el 26% de actividad enzimática a pH 7, lo cual representa un avance importante en la inmovilización de enzimas para fines de remediación ambiental.
- Las nanofibras biocatalíticas presentan características fisicoquímicas deseables que pueden ser aprovechadas en la remoción del TBBPA y otros microcontaminantes; sin embargo, solo pueden inmovilizar pequeñas cargas enzimáticas, por lo cual es importante aumentar el área de este soporte incrementando el tiempo de electrohilado.
- Los productos de degradación enzimática son menos tóxicos y biodegradables que su contraparte sin modificar lo cual disminuye la presión antropogénica al Río Nexapa. Sin embargo, es necesario profundizar en la toxicidad de los productos de reacción, ya que por sí mismos representan un riesgo ambiental al causar la mortandad de los organismos de prueba en las condiciones de operación propuestas en esta investigación.
- Los resultados obtenidos en la caracterización de la PTAR sumados a la detección de TBBPA en la descarga de la planta sugieren deficiencias en el proceso de

tratamiento y contribución a la contaminación del río Nexapa; lo cual representa un riesgo a la salud pública debido a la extracción de agua para riego agrícola de la zona de estudio.

X. REFERENCIAS

- Abd El-aziz, A. M., El-Maghraby, A., & Taha, N. A. (2017). Comparison between polyvinyl alcohol (PVA) nanofiber and polyvinyl alcohol (PVA) nanofiber/hydroxyapatite (HA) for removal of Zn²⁺ ions from wastewater. *Arabian Journal of Chemistry*, *10*(8), 1052–1060. <https://doi.org/10.1016/j.arabjc.2016.09.025>
- Abdel-Fattah, W. I., Jiang, T., El-Bassyouni, G. E. T., & Laurencin, C. T. (2007). Synthesis, characterization of chitosans and fabrication of sintered chitosan microsphere matrices for bone tissue engineering. *Acta Biomaterialia*, *3*(4), 503–514. <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2006.12.004>
- Abou-Elwafa Abdallah, M. (2016). Environmental occurrence, analysis and human exposure to the flame retardant tetrabromobisphenol-A (TBBP-A)-A review. *Environment International*, *94*, 235–250. <https://doi.org/10.1016/j.envint.2016.05.026>
- Aburto, J., Ayala, M., Bustos-jaimés, I., Montiel, C., Domí, M., & Terre, E. (2005). Stability and catalytic properties of chloroperoxidase immobilized on SBA-16 mesoporous materials. *Microporous and Mesoporous Materials*, *83*, 193–200. <https://doi.org/10.1016/j.micromeso.2005.04.008>
- Agudelo, E. A., Gaviria-Restrepo, L. F., Barrios-Ziolo, L. F., & Cardona-Gallo, S. A. (2018). Techniques to determine toxicity in industrial wastewater contaminated with dyes and pigments. *DYNA*, *85*(207), 316–327. <https://doi.org/10.15446/dyna.v85n207.71915>
- Aguilar Hernández, V. S. (2013). *Evaluación de la eficiencia de humedales construidos de flujo vertical para el postratamiento de aguas residuales municipales tratadas por biofiltros*. Universidad Centroamericana Jose Simeón Cañas.
- Alaee, M., Arias, P., Sjödin, A., & Bergman, Å. (2003). An overview of commercially used brominated flame retardants, their applications, their use patterns in different countries/regions and possible modes of release. *Environment International*, *29*(6), 683–689. [https://doi.org/10.1016/S0160-4120\(03\)00121-1](https://doi.org/10.1016/S0160-4120(03)00121-1)
- Albert, L. A. (1997). Contaminación Ambiental. Origen, clases, fuentes y efectos. In Centro Panamericano de Ecología Humana y Salud (Ed.), *Introducción a la toxicología ambiental* (pp. 37–52). México.
- Andresen, J., & Bester, K. (2006). Elimination of organophosphate ester flame retardants and plasticizers in drinking water purification. *Water Research*, *40*(3), 621–629. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2005.11.022>
- Anzaldúa, G., Gerner, N. V., Lago, M., Abhold, K., Hinzmann, M., Beyer, S., ... Birk, S. (2018). Getting into the water with the Ecosystem Services Approach: The DESSIN ESS evaluation framework. *Ecosystem Services*, *30*, 318–326. <https://doi.org/10.1016/j.ecoser.2017.12.004>
- Arroyo, M., Acebal, C., & de la Mata, I. (2017). Biocatalisis y Biotecnología. *Biotecnología Española*, *190*(768), 1–9.
- Arroyo, Miguel. (1998). Inmovilización de enzimas. Fundamentos, métodos y aplicaciones. *Ars Pharmaceutica*, *39*(2), 23–39.
- Aznar-Alemaný, Ò., Aminot, Y., Vilà-Cano, J., Köck-Schulmeyer, M., Readman, J. W., Marques, A., ... Barceló, D. (2018). Halogenated and organophosphorus flame retardants in European aquaculture samples. *Science of the Total Environment*, *612*, 492–500. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2017.08.199>

- Bao, Y., & Niu, J. (2015). Photochemical transformation of tetrabromobisphenol A under simulated sunlight irradiation: Kinetics, mechanism and influencing factors. *Chemosphere*, 134, 550–556. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2014.12.016>
- Barón Gonzalez, E. (2015). *Evaluación del impacto ambiental asociado al uso de nuevos retardantes de llama*. Universidad de Barcelona.
- Barrera Cordero, J., Castro Díaz, J., & Gavilan García, A. (2004). Los retardantes de flama polibromados ¿nuevas sustancias de prioridad ambiental? *Gaceta Ecológica*, (72), 45–52.
- Bes-Monge, S., Silva, A., & Bengoa, C. (2015). *Manual técnico sobre procesos de oxidación avanzada aplicados al tratamiento de aguas residuales industriales*. (Red de Tratamiento y reciclaje de aguas industriales mediante soluciones sostenibles fundamentadas en procesos biológicos, Ed.) (Red Trinto). España: CYTED.
- Bilal, M., Asgher, M., Iqbal, M., & Hu, H. (2016). International Journal of Biological Macromolecules Chitosan beads immobilized manganese peroxidase catalytic potential for detoxification and decolorization of textile effluent. *International Journal of Biological Macromolecules*, 89, 181–189. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2016.04.075>
- Birnbaum, L. S., & Staskal, D. F. (2004). Brominated flame retardants: Cause for concern? *Environmental Health Perspectives*, 112(1), 9–17. <https://doi.org/10.1289/ehp.6559>
- Bolong, N., Ismail, A. F., Salim, M. R., & Matsuura, T. (2009). A review of the effects of emerging contaminants in wastewater and options for their removal. *Desalination*, 239(1–3), 229–246. <https://doi.org/10.1016/j.desal.2008.03.020>
- Bonilla, J., Fortunati, E., Atarés, L., Chiralt, A., & Kenny, J. M. (2014). Physical, structural and antimicrobial properties of poly vinyl alcohol-chitosan biodegradable films. *Food Hydrocolloids*, 35, 463–470. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2013.07.002>
- Branca, C., D'Angelo, G., Crupi, C., Khouzami, K., Rifici, S., Ruello, G., & Wanderlingh, U. (2016). Role of the OH and NH vibrational groups in polysaccharide-nanocomposite interactions: A FTIR-ATR study on chitosan and chitosan/clay films. *Polymer (United Kingdom)*, 99, 614–622. <https://doi.org/10.1016/j.polymer.2016.07.086>
- Caracciolo, P. C., Tornello, P. R. C., Buffa, F., Ballarin, F. M., & Cuadrado, T. R. (2011). Small fibers, great applications. *Ciencia Hoy*, 21(121), 57–64.
- Castillo, R. F. (2005). Biotecnología ambiental. In *Ciclos biogeoquímicos II* (pp. 123–150).
- Corazzari, I., Nisticò, R., Turci, F., Faga, M. G., Franzoso, F., Tabasso, S., & Magnacca, G. (2015). Advanced physico-chemical characterization of chitosan by means of TGA coupled on-line with FTIR and GCMS: Thermal degradation and water adsorption capacity. *Polymer Degradation and Stability*, 112, 1–9. <https://doi.org/10.1016/j.polymdegradstab.2014.12.006>
- CPRAC. (2010). *Report on Brominated Flame-retardants in Mediterranean countries*. Centro de Actividad Regional para la Producción Limpia. Barcelona, Spain: Regional Activity Centre for Cleaner Production.
- Cristale, J., García Vázquez, A., Barata, C., & Lacorte, S. (2013). Priority and emerging flame retardants in rivers: Occurrence in water and sediment, *Daphnia magna* toxicity and risk assessment. *Environment International*, 59, 232–243. <https://doi.org/10.1016/j.envint.2013.06.011>

- Dai, Y., Yin, L., & Niu, J. (2011). Laccase-Carrying Electrospun Fibrous Membranes for Adsorption and Degradation of PAHs in Shoal Soils, 10611–10618. <https://doi.org/10.1021/es203286e>
- De la Cruz, J. C., García, J., & Ayala, M. (2015). Oxidación enzimática de compuestos organoazufrados volátiles y de mal olor, utilizando un reactor de dos fases, 18, 5–12.
- De la Torre Haro, A. (2010). *Contaminantes orgánicos halogenados: PBDE, DBDPE, Decloranes, OH-PBDE y MeO-PBDE. Desarrollo de metodologías analíticas y aplicación a muestras medioambientales*. Universidad Autónoma de Madrid. Retrieved from https://repositorio.uam.es/xmlui/bitstream/handle/10486/6078/37233_torre_haro_adrian_de_la.pdf?sequence=1
- De Wit, C. A. (2002). An overview of brominated flame retardants in the environment. *Chemosphere*, 46(5), 583–624. [https://doi.org/10.1016/S0045-6535\(01\)00225-9](https://doi.org/10.1016/S0045-6535(01)00225-9)
- Debenest, T., Gagné, F., Petit, A., André, C., Kohli, M., & Blaise, C. (2010). Comparative Biochemistry and Physiology , Part C Ecotoxicity of a brominated flame retardant (tetrabromobisphenol A) and its derivatives to aquatic organisms. *Comparative Biochemistry and Physiology, Part C*, 152(4), 407–412. <https://doi.org/10.1016/j.cbpc.2010.06.009>
- del Monte-Martínez, A., Cutiño-avila, B. V, González-Bacerio, J. O., González-Abradelo, D., Figueroa Espí, V., & Cao-Vázquez, R. (2013). Application of enzymes on biocatalysis. Perspectives of the use of nanoarrays as biocatalysts. *Revista Cubana de Ciencias Biológicas*, 2, 7–23.
- Díaz Ramos, M. (2012). *Immobilization of two lipases for use in pre-treatment of wastewater from dairy industry*. Universidad Nacional de Colombia.
- Domínguez-Guilarte, O. L., Ramos-Leal, M., Sánchez-Reyes, A., Manzano-León, A. M., Argüelles-Álvarez, J., Sánchez-López, M. I., & Guerra-Rivera, G. (2011). Biological degradation of persistent organic pollutants by white rot fungi. *Revista CENIC Ciencias Biológicas*, 42(2), 51–59.
- Eljarrat, E., & Barceló, D. (2011). *Brominated Flame Retardants*. (E. Eljarrat & D. Barceló, Eds.), *The Handbook of Environmental Chemistry 16*. Barcelona, Spain: Springer. <https://doi.org/10.1007/698>
- Esmaeili, A., & Beni, A. A. (2014). A novel fixed-bed reactor design incorporating an electrospun PVA/chitosan nanofiber membrane. *Journal of Hazardous Materials*, 280, 788–796. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2014.08.048>
- Eugenia, M., Peña, D., & Ducci, J. (2013). Tratamiento de aguas residuales en México.
- Europea, U. (2008). EU Risk Assessment of 2,2',6,6'- TETRABROMO-4,4'-ISOPROPYLYDENE DIPHENOL, (February), 201–236.
- European Commission. (2008). *European Union Risk Assessment Report 2,2',6,6'-tetrabromo-4,4'-isopropylidenediphenil (tetrabromobisphenol A or TBBPA-A)* (Vol. 63). Luxembourg.
- Ezechiá, M., Covino, S., & Cajthaml, T. (2014). *Ecotoxicology and Environmental Safety Ecotoxicity and biodegradability of new brominated flame retardants: A review* (Vol. 110). <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2014.08.030>
- Fan, M., Zhou, N., Li, P., Chen, L., Chen, Y., Shen, S., & Zhu, S. (2017). Anaerobic co-metabolic biodegradation of tetrabromobisphenol A using a bioelectrochemical system. *Journal of Hazardous Materials*, 321(30), 791–800. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2016.09.068>

- Feng, Y., Lu, K., Gao, S., & Mao, L. (2017). The fate and transformation of tetrabromobisphenol A in natural waters, mediated by oxidoreductase enzymes. *Environ. Sci.: Processes Impacts*, 19(4), 596–604. <https://doi.org/10.1039/C6EM00703A>
- Fenner, R. A. (2017). Water: An essential resource and a critical hazard. *Green Energy and Technology*, (9783319544564), 75–97. https://doi.org/10.1007/978-3-319-54458-8_5
- Figueiredo, K. C. S., Alves, T. L. M., & Borges, C. P. (2009). Poly(vinyl alcohol) Films Crosslinked by Glutaraldehyde Under Mild Conditions. *Journal of Applied Polymer Science*, 111(6), 3074–3080. <https://doi.org/10.1002/app.29263>
- Forero, J.-E., Ortiz, O.-P., & Rios, F. (2005). Aplicación de procesos de oxidación avanzada como tratamiento de fenol en aguas residuales industriales de refinería. *Ciencia, Tecnología y Futuro*, 3(1), 97–109.
- García-Zamora, J. L., León-Aguirre, K., Quiroz-Morales, R., Parra-Saldívar, R., Gómez-Patiño, M. B., Arrieta-Baez, D., ... Torres, E. (2018). Chloroperoxidase-Mediated Halogenation of Selected Pharmaceutical Micropollutants. *Catalysts*, 8(32), 1–16. <https://doi.org/10.3390/catal8010032>
- García, R. (2006). *Sistemas complejos. Conceptos, métodos y fundamentación epistemológica de la investigación interdisciplinaria*. (S. A. Gedisa, Ed.) (1°). Barcelona, España.
- Grover, N., Borkar, I. V., Dinu, C. Z., Kane, R. S., & Dordick, J. S. (2012). Laccase- and chloroperoxidase-nanotube paint composites with bactericidal and sporicidal activity. *Enzyme and Microbial Technology*, 50(6), 271–279. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.enzmictec.2012.01.006>
- Guerra Gómez, P. (2011). *Análisis de retardantes de llama emergentes y su impacto en el medio ambiente y en humanos*. Universidad de Barcelona.
- Gupta, M. N., Kaloti, M., Kapoor, M., & Solanki, K. (2011). Nanomaterials as Matrices for Enzyme Immobilization, 98–109. <https://doi.org/10.3109/10731199.2010.516259>
- Haines-young, R., Potschin, M., & Haines-young, R. (2012). Common International Classification of Ecosystem Services (CICES).
- Han, Q., Dong, W., Wang, H., Ma, H., Liu, P., Gu, Y., ... Song, X. (2019). Chemosphere Degradation of tetrabromobisphenol a by ozonation: Performance , products , mechanism and toxicity. *Chemosphere*, 235, 701–712. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2019.06.204>
- Hernández-Sancho, F., Lamizana-Diallo, B., Mateo-Sagasta, J., & Qadir, M. (2015). *Economic Valuation of Wastewater, the cost of action and the cost of no action*. (UNEP, Ed.). UNEP.
- Hernandez Sampieri, R. (2014). *Metodología dela investigación*.
- Herrera Cárdenas, J. A. (2017). *Evaluación de la Remoción de Contaminantes Emergentes de Aguas Superficiales Mediante Humedales de Tratamiento*. Benemérita Universidad Autónoma de Puebla.
- Hidalgo Cuadrado, N. (2011). *Caracterización químico-física de la peroxidasa de palma Chamaerops excelsa*. Universidad de Salamanca.
- Hou, Y., Peng, Z., Wang, L., Yu, Z., Huang, L., Sun, L., & Huang, J. (2018). Efficient degradation of tetrabromobisphenol A via electrochemical sequential reduction-oxidation: Degradation efficiency, intermediates, and pathway. *Journal of Hazardous Materials*, 343, 376–385. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2017.10.004>

- Illanes, Andres. (2008). *Enzyme Biocatalysis, Principles and Applications*. (Andrés Illanes, Ed.), *Comprehensive Biotechnology, Second Edition* (Vol. 1). <https://doi.org/10.1007/978-1-4020-8361-7>
- INEGI. (2017). *Anuario estadístico y geográfico de Puebla 2017*. (INEGI, Ed.).
- Janssen, S. (2005). *Brominated Flame Retardants: Rising Levels of Concern. Health Care Without Harm*.
- Kaya, M., Akyuz, B., Bulut, E., Sargin, I., Eroglu, F., & Tan, G. (2016). Chitosan nanofiber production from *Drosophila* by electrospinning. *International Journal of Biological Macromolecules*, *92*, 49–55. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2016.07.021>
- Kim, U. J., Oh, J. K., & Kannan, K. (2017). Occurrence, Removal, and Environmental Emission of Organophosphate Flame Retardants/Plasticizers in a Wastewater Treatment Plant in New York State. *Environmental Science and Technology*, *51*(14), 7872–7880. <https://doi.org/10.1021/acs.est.7b02035>
- Koop, S. H. A., & van Leeuwen, C. J. (2017). The challenges of water, waste and climate change in cities. *Environment, Development and Sustainability*, *19*(2), 385–418. <https://doi.org/10.1007/s10668-016-9760-4>
- Lattemann, S., Kennedy, M. D., Schippers, J. C., & Amy, G. (2010). Sustainable water for the future: Water recycling versus desalination. *Sustainability Science and Engineering*, *2*, 7–39. [https://doi.org/10.1016/S1871-2711\(09\)00202-5](https://doi.org/10.1016/S1871-2711(09)00202-5)
- Libralato, G., Prato, E., Migliore, L., Cicero, A. M., & Manfra, L. (2016). A review of toxicity testing protocols and endpoints with *Artemia* spp . *Ecological Indicators*, *69*, 35–49. <https://doi.org/10.1016/j.ecolind.2016.04.017>
- Malkoske, T., Tang, Y., Xu, W., Yu, S., & Wang, H. (2016). A review of the environmental distribution, fate, and control of tetrabromobisphenol A released from sources. *Science of the Total Environment*, *569–570*, 1608–1617. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2016.06.062>
- Martín-Villamill, M., Torres Gavila, J., & Varó Vaello, I. (2016). Evaluación de la toxicidad de metilparabeno en *Artemia franciscana*: efectos sobre crecimiento , supervivencia y biomarcadores. *Revista Iberoamericana Interdisciplinar de Métodos, Modelización y Simulación*, *8*, 103–118.
- Mary, M., Rotková, J., & Sevc, A. (2016). Polyamide 6 / chitosan nanofibers as support for the immobilization of *Trametes versicolor* laccase for the elimination of endocrine disrupting chemicals. *Enzyme and Microbial Technology*, *89*, 31–38. <https://doi.org/10.1016/j.enzmictec.2016.03.001>
- Mauricio-Sánchez, R. A., Salazar, R., Luna-Bárceñas, J. G., & Mendoza-Galván, A. (2018). FTIR spectroscopy studies on the spontaneous neutralization of chitosan acetate films by moisture conditioning. *Vibrational Spectroscopy*, *94*, 1–6. <https://doi.org/10.1016/j.vibspec.2017.10.005>
- Mccormick, J. M., Paiva, M. S., Häggblom, M. M., Cooper, K. R., & White, L. A. (2010). Embryonic exposure to tetrabromobisphenol A and its metabolites , bisphenol A and tetrabromobisphenol A dimethyl ether disrupts normal zebrafish (*Danio rerio*) development and matrix metalloproteinase expression. *Aquatic Toxicology*, *100*(3), 255–262. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2010.07.019>
- Molina-Salinas, G. M., & Said-Fernández, S. (2006). A modified microplate cytotoxicity assay with brine shrimp larvae (*Artemia salina*). *Pharmacologyonline*, *638*(3), 633–638.
- Morales Castillo, G. (2004). *Toxicological tests and methods of water quality assessment. Standardization, intercalibration, results and applications*. (G. Castillo Morales, Ed.), *Centro Internacional de*

- Investigaciones para el Desarrollo* (Vol. 2). México D.F.: Instituto Mexicano de Tecnología del Agua.
- Moreira, J. C., Goncalves, E. S., & Beretta, M. (2013). Contaminantes Emergentes. *Revista de Química Industrial*, 738, 4–13. <https://doi.org/0370694X>
- Morgan, J. M. (2016). Plantas de Tratamiento de Aguas Residuales en la república mexicana, 1–2.
- Navarro, A., Cid, S., Rincon, C., Rosas, E., Aguilar, A., Contreras, S., ... Navarrete, D. (2007). El agua en la Subcuenca del Nexapa, México: necesidad de una gestión integral. Cali, Colombia: Conferencia latinoamericana de saneamiento.
- Navarro, A., Herrera, J., Marrugo, J., Bayona, J., & Morales, L. (2014). Microcontaminantes orgánicos en los ríos de México: El caso del río Nexapa. *De Cuerpos Académicos*. México: ECORFAN.
- Nunes, B. S., Carvalho, F. D., Guilhermino, L. M., & Stappen, G. Van. (2006). Use of the genus *Artemia* in ecotoxicity testing. *Environmental Pollution*, 144, 453–462. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2005.12.037>
- OECD. (1992). *Test No. 301: Ready Biodegradability, OECD Guidelines for the Testing of Chemicals, Section 3*. Paris: OECD Publishing. <https://doi.org/10.1787/978964070349-en>
- ONU. Transformar nuestro mundo: la Agenda 2030 para el Desarrollo Sostenible, 16301 § (2015).
- Padron, J. (2007). Tendencias Epistemológicas de la investigación científica en el siglo XXI. *Revista de Epistemología de Ciencias Sociales*, (28), 1–28.
- Pawlak, A., & Mucha, M. (2003). Thermogravimetric and FTIR studies of chitosan blends. *Thermochimica Acta*, 396(1–2), 153–166. [https://doi.org/10.1016/S0040-6031\(02\)00523-3](https://doi.org/10.1016/S0040-6031(02)00523-3)
- Peng, X., Wang, Z., Wei, D., Huang, Q., & Jia, X. (2017). ScienceDirect Biodegradation of tetrabromobisphenol A in the sewage sludge process. *Journal of Environmental Sciences*, 61, 39–48. <https://doi.org/10.1016/j.jes.2017.02.023>
- PNUMA. (2011). *Convenio de Estocolmo sobre Contaminantes Orgánicos Persistentes*. Retrieved from <http://sinia.minam.gob.pe/documentos/presentacion-nuevos-contaminantes-organicos-persistentes-cop>
- Rahman, F., Langford, K. H., Scrimshaw, M. D., & Lester, J. N. (2001). Polybrominated diphenyl ether (PBDE) flame retardants. *Science of the Total Environment*, 275(1–3), 1–17. [https://doi.org/10.1016/S0048-9697\(01\)00852-X](https://doi.org/10.1016/S0048-9697(01)00852-X)
- Rebia, R., Rozet, S., Tamada, Y., & Tanaka, T. (2018). Biodegradable PHBH/PVA blend nanofibers: Fabrication, Characterization, in vitro degradation, and in vitro biocompatibility. *Polymer Degradation and Stability*. <https://doi.org/10.1016/j.polymdegradstab.2018.05.018>
- Renirie, R., Dewilde, A., Pierlot, C., Wever, R., Hober, D., & Aubry, J.-M. (2008). Bactericidal and virucidal activity of the alkalophilic P395D/L241V/T343A mutant of vanadium chloroperoxidase. *Journal of Applied Microbiology*, 105(1), 264–270. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2008.03742.x>
- Rojas-Remis, R., & Mendoza-Espinosa, L. (2014). Plantas de tratamiento de aguas residuales: una visión como sistema complejo. *Revista Iberoamericana Universitaria En Ambiente, Sociedad y Sustentabilidad (AMBIENS)*, (646), 179–199. <https://doi.org/2346-9269>
- Romo, S., Camacho, C., Gómez, L., Villalonga-Santana, R., Úbeda-Iranzo, J., Arevalo-Villena, M., ... Ramírez,

- H. L. (2012). Inmovilización de celulosa sobre una matriz de quitina-quitosana. *Revista Cubana de Química*, 24(1), 57–64.
- Sampaio, L. M. P., Padrão, J., Faria, J., Silva, J. P., Silva, C. J., Dourado, F., & Zille, A. (2016). Laccase immobilization on bacterial nanocellulose membranes: Antimicrobial, kinetic and stability properties. *Carbohydrate Polymers*, 145, 1–12. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2016.03.009>
- Sathishkumar, P., Kamala-kannan, S., Cho, M., Su, J., Hadibarata, T., Razman, M., & Oh, B. (2014). Enzymatic Laccase immobilization on cellulose nanofiber: The catalytic efficiency and recyclic application for simulated dye effluent treatment. *Journal of Molecular Catalysis. B, Enzymatic*, 100, 111–120. <https://doi.org/10.1016/j.molcatb.2013.12.008>
- Segev, O., Kushmaro, A., & Brenner, A. (2009). Environmental impact of flame retardants (persistence and biodegradability). *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 6(2), 478–491. <https://doi.org/10.3390/ijerph6020478>
- SEGOB. (2018). *Informe Nacional Voluntario para el Foro Político de Alto Nivel sobre el Desarrollo Sostenible*.
- Seino, F., Konosu, Y., Ashizawa, M., Kakihana, Y., Higa, M., & Matsumoto, H. (2018). Polyelectrolyte Composite Membranes Containing Electrospun Ion-Exchange Nanofibers: Effect of Nanofiber Surface Charges on Ionic Transport. *Langmuir*, 34(43), 13035–13040. <https://doi.org/10.1021/acs.langmuir.8b02747>
- SEMARNAT. (2007). *Plan Nacional de Implementación del Convenio de Estocolmo*. Ciudad de México: Secretaria de Medio Ambiente y Recursos Naturales.
- SEMARNAT. (2012). Agua. *Informe de La Situación Del Medio Ambiente En México.*, 258–316. Retrieved from http://app1.semarnat.gob.mx/dgeia/informe_12/06_agua/cap6_1.html
- SEMARNAT. (2015). *Inventario Nacional de Plantas Municipales de Potabilización y de Tratamiento de Aguas Residuales en Operación*. Ciudad de México.
- Sun, F., Kolvenbach, B. A., Nastold, P., Jaing, B., Ji, R., & Corvini, P. F.-X. (2014). Degradation and Metabolism of Tetrabromobisphenol A (TBBPA) in Submerged Soil and Soil – Plant Systems. *Environmental Science and Technology*, 48, 14291–14299. <https://doi.org/10.1021/es503383h>
- Tighzert, W., Habi, A., Ajji, A., Sadoun, T., & Daoud, F. B. O. (2017). Fabrication and characterization of nanofibers based on poly(lactic acid)/chitosan blends by electrospinning and their functionalization with phospholipase A1. *Fibers and Polymers*, 18(3), 514–524. <https://doi.org/10.1007/s12221-017-6953-x>
- Troitzsch, J. H. (1983). Methods for the fire protection of plastics and coatings by flame retardant and intumescent systems. *Progress in Organic Coatings*, 11(1), 41–69. [https://doi.org/10.1016/0033-0655\(83\)80003-X](https://doi.org/10.1016/0033-0655(83)80003-X)
- UNEP. (2011). *Stockholm Convention on Persistent Organic Pollutants*. (United Nations Environment Programme, Ed.). Switzerland: Secretariat of the Stockholm Convention.
- UNESCO. (2017). *Aguas residuales, El recurso desaprovechado*. Francia.
- Vahabi, H., Sonnier, R., & Ferry, L. (2015). Effects of ageing on the fire behaviour of flame-retarded polymers: A review. *Polymer International*, 64(3), 313–328. <https://doi.org/10.1002/pi.4841>

- Valderrama, B., Ayala, M., & Vazquez-duhalt, R. (2002). Suicide Inactivation of Peroxidases and the Challenge of Engineering More Robust Enzymes. *Chemistry & Biology*, 9(02), 555–565.
- Venegas Mata, E., & Naranjo Aguilar, F. (2010). *Manual sobre el Manejo de Contaminantes Orgánicos Persistentes*. (C. de G. T. e I. I. (CEGESTI), Ed.) (4th ed.). Costa Rica.
- Waijers, S. L., Kong, D., Hendriks, H. S., Wit, C. A. De, Cousins, I. T., Westerink, R. H. S., ... Whitacre, D. M. (2013). *Reviews of Environmental Contamination and Toxicology. Reviews of Environmental Contamination and Toxicology* (Vol. 222). <https://doi.org/10.1007/978-1-4614-4717-7>
- Wang, Z., Wan, L., Liu, Z., Huang, X., & Xu, Z. (2009). Journal of Molecular Catalysis B : Enzymatic Enzyme immobilization on electrospun polymer nanofibers: An overview, 56, 189–195. <https://doi.org/10.1016/j.molcatb.2008.05.005>
- Wei, G. L., Li, D. Q., Zhuo, M. N., Liao, Y. S., Xie, Z. Y., Guo, T. L., ... Liang, Z. Q. (2015). Organophosphorus flame retardants and plasticizers: Sources, occurrence, toxicity and human exposure. *Environmental Pollution*, 196, 29–46. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2014.09.012>
- Wong, D. E., Dai, M., Talbert, J. N., Nugen, S. R., & Goddard, J. M. (2014). Biocatalytic polymer nanofibers for stabilization and delivery of enzymes. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 110, 16–22. <https://doi.org/10.1016/j.molcatb.2014.09.007>
- Wu, Y., Wang, Y., Lin, Z., Wang, Y., Li, Y., Liu, S., & Gui, X. (2019). Separation and Purification Technology Three-dimensional α -Fe₂O₃ / amino-functionalization carbon nanotube sponge for adsorption and oxidative removal of tetrabromobisphenol A. *Separation and Purification Technology*, 211(October 2018), 359–367. <https://doi.org/10.1016/j.seppur.2018.10.002>
- Xu, R., Si, Y., Wu, X., Li, F., & Zhang, B. (2014). Triclosan removal by laccase immobilized on mesoporous nanofibers : Strong adsorption and efficient degradation. *CHEMICAL ENGINEERING JOURNAL*, 255, 63–70. <https://doi.org/10.1016/j.cej.2014.06.060>
- Xu, R., Tang, R., Liu, S., Li, F., & Zhang, B. (2015). An environmentally-friendly enzyme-based nanofibrous membrane for 3,3',5,5'-tetrabromobisphenol removal. *RSC Advances*, 5(79), 64091–64097. <https://doi.org/10.1039/C5RA09090C>
- Xu, R., Zhou, Q., Li, F., & Zhang, B. (2013). Laccase immobilization on chitosan/poly(vinyl alcohol) composite nanofibrous membranes for 2,4-dichlorophenol removal. *Chemical Engineering Journal*, 222, 321–329. <https://doi.org/10.1016/j.cej.2013.02.074>
- Yamauchi, K. (2017). Tetrabromobisphenol A. In Y. Takei & K. Tsutsui (Eds.), *Handbook of Hormones* (2nd ed., pp. 681–710). Elsevier.
- Yang, S.-W., Xu, F.-F., & Zhao, M.-D. (2013). Distribution and bioaccumulation of tetrabromobisphenol A in *Carassius auratus* tissues and its pathological effect. *Zhongguo Huanjing Kexue/China Environmental Science*, 33(4), 741–747.
- Yu, D., Duan, H., Song, Q., Liu, Y., Li, Y., Li, J., ... Wang, J. (2017). Characterization of brominated flame retardants from e-waste components in China. *Waste Management*, 68, 498–507. <https://doi.org/10.1016/j.wasman.2017.07.033>
- Zeng, Q., Qin, J., Yin, X., Liu, H., Zhu, L., Dong, W., & Zhang, S. (2016). Preparation and hemocompatibility of electrospun O-carboxymethyl chitosan/PVA nanofibers. *Journal of Applied Polymer Science*, 133(26), 2–9. <https://doi.org/10.1002/app.43565>

- Zhou, X., Guo, J., Zhang, W., Zhou, P., Deng, J., & Lin, K. (2014). Tetrabromobisphenol A contamination and emission in printed circuit board production and implications for human exposure. *Journal of Hazardous Materials*, 273, 27–35. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2014.03.003>
- Zimmermann, Y. S., Shahgaldian, P., Corvini, P. F. X., & Hommes, G. (2011). Sorption-assisted surface conjugation: A way to stabilize laccase enzyme. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 92(1), 169–178. <https://doi.org/10.1007/s00253-011-3534-6>