

ESCUELA SUPERIOR POLITÉCNICA DEL LITORAL

Facultad de Ciencias de la Vida

Diseño de un protocolo óptimo para extracción de microplásticos en tejidos

PROYECTO INTEGRADOR

Previo la obtención del Título de:

Biólogo

Presentado por:

María Belén Garzón Ramírez

GUAYAQUIL - ECUADOR

Año: 2022

DEDICATORIA

Para Blacky,
por no dejarme ni cuando me dejó.

AGRADECIMIENTOS

A mi familia, los que están lejos y los que no tanto. Mis padres, mis cuatro hermanos y en especial a mis abuelitos y a mi tía, gracias por siempre esperarme. Gracias a Gorki, porque cuando pensaba que ya no le quedaba paciencia me sorprendía con más.

Al laboratorio de Contaminación y Salud Ambiental, a mi tutor, Gustavo Domínguez, a las chicas y muy especialmente a Juli, gracias por darme un espacio seguro para hacer muchas preguntas. A mis docentes, compañeros y amigos, quienes me permitieron aprender de ellos durante toda la carrera, en especial a Alyssa y Byron, con quienes las risas no faltaron.

DECLARACIÓN EXPRESA

“Los derechos de titularidad y explotación, me corresponde conforme al reglamento de propiedad intelectual de la institución; *María Belén Garzón Ramírez* doy mi consentimiento para que la ESPOL realice la comunicación pública de la obra por cualquier medio con el fin de promover la consulta, difusión y uso público de la producción intelectual”

A handwritten signature in blue ink that reads "María Belén Garzón Ramírez". The signature is written in a cursive style and is positioned above a horizontal line.

María Belén Garzón Ramírez

EVALUADORES

Diego Arturo Gallardo Polit

PROFESOR DE LA MATERIA

Gustavo Adolfo Domínguez Cazco

PROFESOR TUTOR

RESUMEN

La contaminación por MPs es una preocupación ambiental creciente debido a su detección tanto en productos de consumo como en fluidos humanos. Debido a la diversidad de metodologías existentes, el presente trabajo busca aportar al estudio de MPs en tejido animal. Para lo cual se propone diseñar un protocolo de digestión para tejidos animales blandos mediante la comparación de metodologías existentes. Para esto se aplicaron metodologías de digestión relevantes para su evaluación. Se seleccionaron mejillones como organismos de interés, los cuales fueron muestreados en un ecosistema de manglares del golfo de Guayaquil. Como parte del proceso de laboratorio se extrajo el tejido blando de los organismos para su digestión, empleando H_2O_2 al 20%, KOH 4M y NaOH 10M, como se recomienda en la literatura. Además, en réplicas del proceso se agregaron MPs junto al tejido para evaluar su peso y apariencia antes y después de los tratamientos con el fin de determinar el efecto de cada proceso de digestión sobre estos. Se realizó un análisis de costos y una evaluación cualitativa de desempeño de cada reactivo donde se evaluaron factores como la capacidad de digestión, conservación de partículas de plástico, facilidad de visualización, entre otras. A pesar de que no se detectaron diferencias significativas en cuanto a la capacidad de digestión y conservación de las muestras, se seleccionó al KOH como el reactivo más adecuado mediante la evaluación cualitativa ya que no dañó la superficie de la muestra, tuvo precio conveniente y su implementación permitió una buena facilidad de visualización.

Palabras Clave: microplásticos, tejido blando, digestión, protocolo

ABSTRACT

Microplastic pollution is a growing environmental concern due to its detection in both consumer products and human fluids. Due to the vast number of existing methodologies, the present work seeks to contribute to the study of MPs in animal tissue. To achieve this, I propose the design of a digestion protocol for animal soft tissues by comparing existing methodologies. For this, relevant digestion methodologies were applied and evaluated. Mussels were selected as study subjects and were sampled in a mangrove ecosystem in the Gulf of Guayaquil. As part of the laboratory process, the soft tissue of the organisms was extracted for digestion, using 20% H₂O₂, 4M KOH and 10M NaOH, as stated in the literature. In addition, MPs were added to some tissue samples to evaluate their weight and appearance before and after the treatments to determine the effect of each digestion process on them. A cost analysis and a qualitative performance evaluation of each reagent were carried out where factors such as digestion capacity, conservation of plastic particles, ease of visualization, among others, were evaluated. Even though no significant differences were detected in terms of the digestion and conservation capacity of the samples, KOH was selected as the most appropriate reagent through qualitative evaluation, since it did not damage the surface of the sample, it had a convenient price, and its implementation allowed a good ease of visualization.

Keywords: microplastics, soft tissue, digestion, protocol

ÍNDICE GENERAL

RESUMEN.....	I
ABSTRACT	II
ÍNDICE GENERAL	III
ABREVIATURAS.....	V
SIMBOLOGÍA.....	VI
ÍNDICE DE FIGURAS	VII
ÍNDICE DE TABLAS.....	VIII
1. INTRODUCCIÓN.....	1
1.1. Descripción del problema	1
1.2. Justificación del problema	2
1.3. Objetivos.....	2
1.3.1. Objetivo General.....	2
1.3.2. Objetivos Específicos	2
1.4. Marco teórico.....	3
1.4.1. MPs en los ecosistemas.....	3
1.4.2. Tejidos relevantes para la detección de MPs	4
1.4.3. Técnicas de digestión de tejidos ampliamente utilizadas	5
2. METODOLOGÍA.....	6
2.1. Colección y almacenamiento de muestras	6
2.2. Digestión de tejidos	6
2.2.1. Digestión mediante Hidróxido de Sodio.....	6
2.2.2. Digestión mediante solución de hidróxido de potasio.....	7
2.2.3. Digestión mediante peróxido de hidrógeno	7
2.3. Evaluación de capacidad de digestión.....	7
2.4. Evaluación de preservación de la muestra y facilidad de visualización	7
2.5. Análisis de costos	8
2.6. Evaluación de desempeño de cada reactivo	8
2.7. Análisis estadístico	9
3. RESULTADOS Y ANÁLISIS.....	10
3.1. Evaluación de capacidad de digestión.....	10
3.2. Evaluación de preservación de la muestra	11
3.3. Análisis estadístico	12
3.4. Evaluación de facilidad de visualización.....	12

3.5. Análisis de costos	13
3.6. Evaluación de desempeño de cada reactivo	14
1. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES.....	15
4.1. Conclusiones	15
4.2. Recomendaciones	15
BIBLIOGRAFÍA.....	17

ABREVIATURAS

MP	Microplásticos
PP	Polipropileno
HDEP	Polietileno de alta densidad
PET	Tereftalato de polietileno
PETG	Glicol de tereftalato de polietileno
RPFMS	Reserva de Producción de Fauna Manglares El Salado
HNO ₃	Ácido nítrico
HClO ₄	Ácido perclórico
HCl	Ácido clorhídrico
H ₂ O ₂	Peróxido de hidrógeno
KOH	Hidróxido de potasio
NaOH	Hidróxido de sodio

SIMBOLOGÍA

mm	Milímetro
mg	Miligramo
μm	Micrómetro
ml	Mililitro
$^{\circ}\text{C}$	Grados Celsius
g	Gramo
μ	Media
$\mu_{1/2}$	Mediana
kg	Kilogramo
M	Molar

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 3.4.1 MPs de PETG y PP bajo estereoscopio antes y después de los tratamientos.	12
Figura 3.4.2 MPs de HDPE y PET bajo estereoscopio antes y después de los tratamientos.....	12
Figura 3.6.1 Representación gráfica de la evaluación cualitativa de desempeño de cada reactivo.....	14

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 2.6.1 Métodos de evaluación y sistemas de calificación para desempeño de reactivos.	8
Tabla 3.1.1 Capacidad de digestión por método	10
Tabla 3.2.1 Mediciones de pérdida de muestra (MP)	11
Tabla 3.5.1 Precios de reactivos obtenidos de cotización con proveedores.	13
Tabla 3.6.1 Evaluación cualitativa de desempeño de cada reactivo.	14

CAPÍTULO 1

1. INTRODUCCIÓN

1.1. Descripción del problema

Desde su inicio en la década de 1950 la producción masiva de plásticos ha crecido hasta producir un total estimado de 8300 millones de toneladas métricas en 2017 (Geyer et al., 2017). Aunque el mercado global del reciclaje alcanzó los \$33 mil millones para el año 2020, se espera que incremente hasta \$47.3 mil millones en 2026 (Wood, 2021). Sin embargo, el plástico se ha convertido en un problema cuando es liberado al ambiente. Además, se estima que las pérdidas económicas anuales causadas por la contaminación plástica en los ecosistemas marinos se encuentran cerca de los \$13 mil millones (Carlson, 2009). Por ejemplo, se evaluó que el costo ambiental de los contaminantes plásticos en el suelo y el agua es de \$362 y \$626 por tonelada, respectivamente. Lo que sugiere que la gestión de los desechos debe mejorar ampliamente, además, se ha establecido que esta mejora puede ahorrar un 30% de los costos ambientales (Wood, 2021).

Uno de los factores más preocupantes en cuanto a la contaminación plástica es la presencia de los llamados microplásticos (MPs). Éstos son partículas de plástico que miden menos de 5 mm que se originan de dos formas. De forma directa, cuando se elaboran productos domésticos o industriales conformados por materiales de estas características, y de forma indirecta a partir de la fragmentación de productos plásticos desechados al ambiente. Los MPs pueden acumularse en ambientes terrestres, zonas costeras, altamar (Barnes et al., 2009), polos árticos y antárticos (Materić et al., 2022) e incluso en organismos como los humanos (Leslie et al., 2022; Ragusa et al., 2022; Zhu et al., 2023). La investigación de este tipo de contaminación es relativamente reciente y, aunque las implicaciones reales de su presencia en el ambiente aún son impredecibles (Vethaak & Leslie, 2016), se reconoce que representan un alto riesgo potencial para la salud del medio ambiente y de las especies animales en los diferentes niveles de las cadenas tróficas (XiaoZhi, 2021).

1.2. Justificación del problema

La presencia de MPs puede evaluarse en diversas matrices ambientales y biológicas como: agua (Koelmans et al., 2019), suelo (Hu et al., 2022), sedimentos (Li et al., 2021) e incluso tejidos (Ding et al., 2022). Particularmente, las matrices biológicas son de gran importancia por su potencial como indicador de contaminación por MPs proveniente de las matrices ambientales (Ding et al., 2021). Además, la movilización de MPs en cadenas tróficas va a depender del organismo en que ocurre la captación de este contaminante.

Debido a la variedad de metodologías disponibles para la digestión de tejidos para la extracción de MPs, la cantidad de tejidos que pueden ser estudiados, los recursos disponibles para desarrollar este tipo de investigación, la necesidad de estandarización de métodos con el fin de establecer niveles de exposición, la comparación entre estudios existentes para evaluaciones sólidas de los riesgos de la presencia de MPs en el medio ambiente, el presente trabajo propone el desarrollo de un protocolo para la digestión de tejidos que ayude fácilmente a extraer los MPs para su estudio.

1.3. Objetivos

1.3.1. Objetivo General

Diseñar un protocolo de digestión para tejidos animales blandos mediante la comparación de metodologías aplicables para la optimización del proceso de extracción de MPs.

1.3.2. Objetivos Específicos

- a) Realizar un levantamiento de información sobre las metodologías de digestión para la identificación de reactivos relevantes.
- b) Analizar la capacidad de preservación de muestra de cada reactivo midiendo su efecto sobre muestras de MPs conocidas y el tejido blando digerido.
- c) Analizar la capacidad de digestión de tejido blando de cada reactivo midiendo el porcentaje de tejido digerido durante la implementación.
- d) Evaluar de forma cualitativa el desempeño de cada reactivo considerando factores relacionados con la facilidad de aplicación

1.4. Marco teórico

1.4.1. MPs en los ecosistemas

Las fuentes primarias de MPs son los polvos empleados en cosméticos, pintura, revestimientos y detergentes, sin embargo, existen fuentes secundarias como fragmentación de desechos plásticos, abrasión de llantas, polvo urbano y telas sintéticas (Carlson, 2009).

Actualmente los desechos plásticos y especialmente los MPs en ecosistemas acuáticos generan problemas que ponen en riesgo a las poblaciones de invertebrados acuáticos como poliquetos, crustáceos y zooplancton (GESAMP, 2015), además del necton y toda la biodiversidad marina. En ecosistemas acuáticos, la degradación de los desechos plásticos pueden liberar químicos, aditivos (plastificadores) y otros componentes como hidrocarburos aromáticos policíclicos, bifenilos policlorinados, químicos con efectos disruptivos endócrinos (androgénicos o estrogénicos), éteres difenilos polibromados, materia orgánica disuelta y particulada, así como carbono orgánico disuelto (Roy et al., 2022).

En ecosistemas terrestres, los MPs también afectan a la biota del suelo, la germinación de semillas, crecimiento y productividad de plantas (Qi et al., 2018; Rillig et al., 2017). Por otro lado, el mantillo empleado en la agricultura es considerado una de las fuentes principales de contaminación por MPs junto al uso de compost, lodos de depuradoras, aguas de irrigación, deposición atmosférica, polvo de carreteras y biosólidos (Roy et al., 2022). Los biosólidos son materia orgánica recuperada de aguas residuales que se usan frecuentemente como fertilizantes en agricultura. La concentración de MPs en este material se ha reportado en concentraciones de entre 259 a 381 kg/ha en China y 41.4 partículas por gramo en Australia (Ziajahromi et al., 2021).

Un aspecto importante de los efectos de la contaminación plástica es la migración de MPs desde el suelo a sistemas acuáticos, incluyendo los marinos, de agua dulce o sistemas de aguas subterráneas, puede ocurrir por procesos como escorrentía de superficie, bioturbación, labranza, infiltración, erosión por viento, y pastoreo (Boots et al., 2019; Hurley & Nizzetto, 2018).

A pesar de que los MPs contaminan cuerpos de agua frecuentemente, la migración depende del tamaño, forma y características superficiales de las partículas (Zhang et al., 2018). En consecuencia, los manglares son ecosistemas donde la contaminación plástica causa un impacto que necesita ser evaluado. Estos ecosistemas son de gran importancia para el estudio de la contaminación por MPs debido a sus funciones como ecosistema de transición. Los árboles de mangle ocupan la franja intermareal y desarrollan un sistema de raíces parcialmente sumergido, con neumatóforos y raíces de sostén, actuando como un filtro capaz de retener objetos flotantes arrastrados por las corrientes, así como aportes de las escorrentías desde los ecosistemas terrestres (Horstman et al., 2014).

Los estudios llevados a cabo más ampliamente en Ecuador se centran en productos de consumo humano (Diaz-Basantes et al., 2020, 2022; Paredes et al., 2019), ambientales y también en organismos. Las matrices ambientales más estudiadas son las acuáticas, ya sea en zonas estuarinas, rivereñas u oceánicas.

1.4.2. Tejidos relevantes para la detección de MPs

El análisis de los impactos ambientales de la presencia de MPs tiene una gran variedad de dificultades debido a los cambios en las funciones de los ecosistemas, impactos peligrosos en la biota y variabilidad en las toxicidades inducidas por su composición (Wagner & Lambert, 2018). Además, en los análisis a nivel de individuo, los requerimientos metodológicos pueden variar entre organismos debido a la presencia de tejidos quitinosos en crustáceos o del contenido intestinal en peces grandes (EFSA, 2016).

Los mejillones son considerados buenos candidatos para evaluaciones de exposición a MPs ya que están presentes en un amplio rango de distribución, filtran grandes volúmenes de agua, son relativamente inmóviles y su recolección es accesible a lo largo de todo el año (Catarino et al., 2017). Debido a estas características los mejillones pueden actuar como especie centinela, un ejemplo de este uso aplicado para otros tipos de contaminantes es el programa de monitoreo Mussel Watch (NOAA, 2015).

Debido a la relevancia de los estudios en la zona de interés, especies de matrices acuáticas resultan las más adecuadas para el presente trabajo, un método estandarizado para la digestión de tejidos de mejillones puede aportar a la replicabilidad de este tipo de investigaciones.

1.4.3. Técnicas de digestión de tejidos ampliamente utilizadas

La implementación de las técnicas de extracción de MPs más comunes pueden destruir parcialmente o por completo las partículas de plástico, así como alterar su forma debido a degradación (Catarino et al., 2017). Esto es importante debido a que puede haber pérdidas representativas de las partículas de menor tamaño.

Los métodos empleados generalmente utilizan digestiones químicas con un tipo de ácido fuertes o en mezclados con otros ácidos (HNO_3 , HClO_4 , HCl) (Claessens et al., 2013; De Witte et al., 2014) y bases (NaOH , KOH) (Rochman et al., 2015). Además, se suele emplear el peróxido de hidrógeno (H_2O_2) (Mathalon & Hill, 2014). Un método altamente óptimo es la digestión enzimática, sin embargo, los altos costos que este representa lo vuelven poco accesible (Cole et al., 2014).

CAPÍTULO 2

2. METODOLOGÍA

2.1. Colección y almacenamiento de muestras

El muestreo se llevó a cabo en un ecosistema de manglares del Golfo de Guayaquil, específicamente dentro de la Reserva de Producción de Fauna Manglares El Salado (RPFMS), donde se seleccionaron cuatro sitios de muestreo: 3 Bocas (2°14'23.2"S 79°58'00.6"O), Plano Seco (2°13'23.7"S 79°57'59.1"W), Madre Costal (2°13'04.8"S 79°59'47.9"W) y Puerto Hondo (2°11'48.3"S 80°01'51.0"W). En cada sitio se seleccionaron tres puntos donde se recolectaron 20 individuos que se colocaron en papel de aluminio y luego en una funda etiquetada. Asimismo, se utilizó en cada sitio un blanco para contaminación atmosférica previamente humedecido con agua ultrapura filtrada (0.2 µm) para descartar la posible exposición de la muestra a la presencia de MPs en el aire.

Las muestras de mejillones fueron transportadas al laboratorio de Contaminación y Salud Ambiental de la ESPOL donde fueron almacenadas a -20°C para su posterior análisis.

2.2. Digestión de tejidos

De cada punto de muestreo se seleccionaron 3 individuos de acuerdo con parámetros físicos básicos similares como la longitud del bivalvo y el peso corporal húmedo total. El tejido blando de los individuos se diseccionó cuidadosamente y la digestión se realizó con cada uno de los diferentes reactivos en tres individuos por reactivo por separado.

2.2.1. Digestión mediante Hidróxido de Sodio

Empleando una solución de hidróxido de sodio 10M el tejido blando fue digerido a 50°C hasta que la solución alcanzó una apariencia uniforme con el fin de facilitar la visualización durante el análisis. El proceso llevó más tiempo de lo esperado debido a la falta de movimiento a los tubos de ensayo (72 horas).

2.2.2. Digestión mediante solución de hidróxido de potasio

Empleando una solución de hidróxido de potasio 4M el tejido blando fue digerido a 50°C hasta que la solución alcance una apariencia uniforme con el fin de facilitar la visualización durante el análisis.

2.2.3. Digestión mediante peróxido de hidrógeno

Empleando una solución de peróxido de hidrógeno al 20% el tejido blando fue digerido a 50°C hasta que la solución alcance una apariencia uniforme con el fin de facilitar la visualización durante el análisis

Los procesos de digestión se llevaron a cabo durante 72 horas, dando rotación a los tubos de ensayo cada 24 horas para mejorar el proceso de digestión.

2.3. Evaluación de capacidad de digestión

Previo al proceso de filtración se tomó el peso en seco de los filtros a emplearse durante el análisis de cada material orgánico digerido, luego se realizó el filtrado con una bomba al vacío y se secó el contenido a 40°C durante 48 horas para posteriormente pesarlo. A partir de esto se obtuvo la eficiencia de la digestión con el peso inicial del tejido basada en la remoción relativa de materia orgánica.

2.4. Evaluación de preservación de la muestra y facilidad de visualización

Fragmentos de plástico: polipropileno (PP), tereftalato de polietileno (PET), glicol de tereftalato de polietileno (PETG), polietileno de alta densidad (HDPE), fueron tratados con los mismos protocolos con los que se trataron las muestras.

Para la evaluación, se registró el peso de cada grupo de MPs en seco y se llevó a cabo la exposición a los tratamientos. Luego, se pesó cada grupo después de los tratamientos para calcular el porcentaje de pérdida.

2.5. Análisis de costos

Se tomaron en cuenta datos de un muestreo real considerando cuatro sitios de muestreo con tres puntos en cada sitio y diez individuos por punto. Se calcularon las cantidades necesarias de cada reactivo contemplando la preparación de soluciones, de acuerdo con la cantidad de tejido blando. A partir de esta información se llevó a cabo una cotización con un proveedor.

2.6. Evaluación de desempeño de cada reactivo

Se realizó un análisis cualitativo de diferentes factores como: precio, capacidad de digestión, conservación de muestra, conservación de superficie del plástico y facilidad de visualización con la finalidad de evaluar el rendimiento general de cada reactivo y facilitar la selección del más adecuado. Se dio una calificación del 1 al 5 para cada factor por cada reactivo. Los métodos de evaluación y sistemas de calificación por parámetro se resumen en la Tabla 2.6.1.

Tabla 2.6.1 Métodos de evaluación y sistemas de calificación para desempeño de reactivos.

Parámetros	Métodos de evaluación	Sistema de calificación
Mejor precio	Cotizaciones a proveedores	5 – más económico 1 – más caro
Capacidad de digestión	Porcentaje de peso seco de tejidos blandos digeridos y observación bajo estereoscopio	5 – mayor porcentaje de tejido blando digerido y menor cantidad de restos de tejidos blandos visualizados durante análisis 1 – menor porcentaje de tejido blando digerido y mayor cantidad de restos de tejidos blandos visualizados durante análisis
Conservación de muestra	Peso de MPs antes y después de tratamiento	5 – mayor disminución de peso 1 – menor disminución de peso
Conservación de superficie del plástico	Observación bajo estereoscopio	5 – menos cambios en la superficie del MP 1 – Más cambios en la superficie del MP – Esta calificación es subjetiva.
Facilidad de visualización	Observación bajo estereoscopio	5 – menor interferencia de residuos de tejidos blandos 1 – mayor interferencia de residuos de tejidos blandos – Esta calificación es subjetiva

2.7. Análisis estadístico

Para comparar si existe una diferencia significativa entre el desempeño de los diferentes métodos de digestión, se evaluó la capacidad de digestión medida en peso total digerido, se empleó ANOVA de una vía con comparación múltiple de Tukey. Para lo cual se probaron los supuestos necesarios: normalidad en los datos mediante la prueba de Shapiro-Wilk y homogeneidad de varianzas mediante la prueba de Levene. Se llevaron a cabo las mismas pruebas para la evaluación de pérdida de muestra medida en pérdida de peso de MP, empleando la prueba de normalidad de Shapiro-Wilk y la prueba de Kruskal-Wallis para diferencia de rangos medios.

CAPÍTULO 3

3. RESULTADOS Y ANÁLISIS

3.1. Evaluación de capacidad de digestión

Debido a que se emplearon protocolos revisados y probados previamente, los tres tratamientos empleados presentaron una eficiencia bastante alta que se detalla en la Tabla 3.1.1. A pesar de esto, la inspección visual de los filtros demostró la presencia de residuos de tejidos (menos de 0.01 g) con todos los métodos probados.

Tabla 3.1.1 Capacidad de digestión por método

Tratamiento	Peso inicial Organismo (mg)	Peso seco Filtro (mg)	Peso seco Filtro después de filtración (mg)	Peso seco final Organismo (mg)	Porcentaje promedio de materia orgánica digerido (%)
1KOH	0.0905	0.0771	0.0775	0.0004	99.296
2KOH	0.0709	0.0710	0.0717	0.0007	
3KOH	0.0731	0.0678	0.0683	0.0005	
1NaOH	0.0498	0.0726	0.0726	0.000	98.379
2NaOH	0.0626	0.0732	0.0739	0.0007	
3NaOH	0.0908	0.0730	0.0764	0.0034	
1H ₂ O ₂	0.0614	0.0716	0.0718	0.0002	99.565
2H ₂ O ₂	0.0824	0.0736	0.0741	0.0005	
3H ₂ O ₂	0.1077	0.0763	0.0767	0.0004	

3.2. Evaluación de preservación de la muestra

Los porcentajes de pérdida de MPs pueden estar sujetos a varios factores no dependientes del tratamiento como pérdida durante el proceso de filtración o visualización previa. Así como a factores dependientes del tratamiento como desgaste en la superficie de los MPs por reacción corrosiva o pérdida de la partícula completa a causa de la reacción que produjo burbujas. Los resultados de estas pruebas se muestran en la Tabla 3.2.1.

Tabla 3.2.1 Mediciones de pérdida de muestra (MP)

Tratamiento	Peso inicial MPs (mg)	Peso final MPs (mg)	Pérdida de MPs en peso (mg)	Porcentaje promedio de MPs perdidos (%)
HDPE KOH	0.0267	0.0264	0.0003	6.454
PP KOH	0.0004	0.0004	0	
PETG KOH	0.0046	0.0046	0	
PET KOH	0.0085	0.0064	0.0021	
HDPE NaOH	0.0330	0.0327	0.0003	16.497
PP NaOH	0.0003	0.0003	0	
PETG NaOH	0.0060	0.0037	0.0023	
PET NaOH	0.0086	0.0063	0.0023	
HDPE H ₂ O ₂	0.0334	0.0216	0.0118	22.934
PP H ₂ O ₂	0.0007	0.0005	0.0002	
PETG H ₂ O ₂	0.0034	0.0027	0.0007	
PET H ₂ O ₂	0.0069	0.0064	0.0005	

3.3. Análisis estadístico

Se concluyó que los tratamientos no son diferentes desde el punto de vista estadístico en cuanto a la capacidad de digestión de tejido blando, medida en peso total digerido y a la pérdida de muestra medida en pérdida de peso de MP, durante el proceso de digestión. Debido a esto, para elegir entre los reactivos de mejor desempeño se emplearon otros factores ajenos al análisis de capacidad de digestión o conservación de partículas de MP.

3.4. Evaluación de facilidad de visualización

Se evaluó la visualización mediante imágenes bajo el estereoscopio, las figuras **¡Error! No se encuentra el origen de la referencia.¡Error! No se encuentra el origen de la referencia.** muestran las partículas de plástico tratadas con los diferentes reactivos.

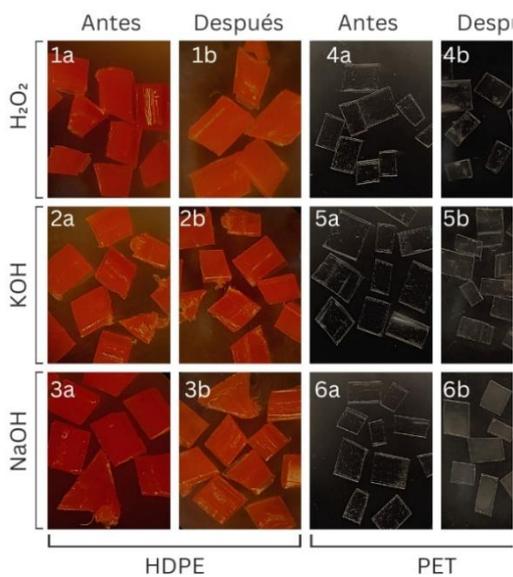


Figura 3.4.1 MPs de PETG y PP bajo estereoscopio antes y después de los tratamientos.

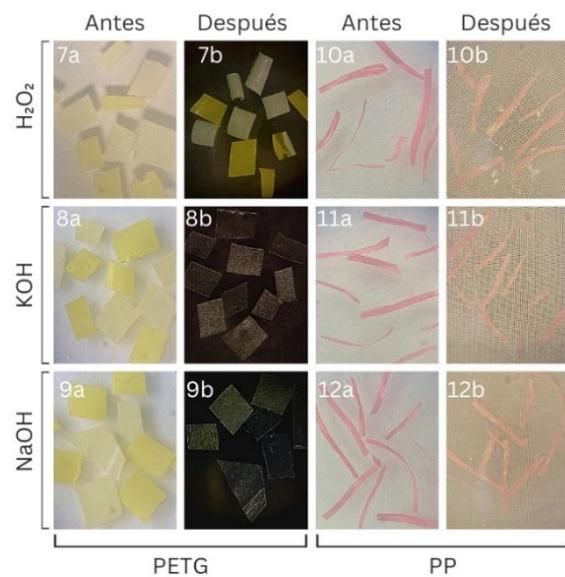


Figura 3.4.2 MPs de HDPE y PET bajo estereoscopio antes y después de los tratamientos.

En las figuras **¡Error! No se encuentra el origen de la referencia.** y **¡Error! No se encuentra el origen de la referencia.**, se destacan varios detalles acerca de la apariencia de los MPs después de los tratamientos. Por ejemplo, no se demuestra daño en las partículas de HDPE ni del PP, para ningún tratamiento, sin embargo,

en la imagen 1b y 4b se demuestra que la implementación de H₂O₂ puede producir pérdida de la partícula completa debido a su reacción química que produjo burbujas. La imagen 7b demuestra que este mismo tratamiento puede alterar la forma de ciertas partículas de plástico dificultando su visualización.

Por otro lado, las imágenes 4b, 5b y 10b demuestran residuos de tejidos junto a los MPs, lo cual puede interferir con la visualización cuando se trabaje con partículas de plástico más pequeñas. Además, las imágenes 7b y 8b denotan una pérdida total y parcial de la coloración del plástico, esto puede deberse a que el PETG es un derivado del PET que se caracteriza por su capacidad para ser termoformado. Esta característica permite al PETG ser comúnmente empleado en etiquetas de manga que son aplicadas con calor y que toman la forma de los empaques. Este tipo de plástico normalmente adquiere su color mediante adherencia de pigmento por impresiones, por lo tanto, el desgaste ocurre sobre dicho pigmento.

Finalmente, la imagen 6b demuestra un desgaste en la superficie de las partículas de PET mediante el tratamiento con NaOH, esta consideración es importante debido a que el PET es uno de los tipos de plásticos más abundantes en el ambiente, por lo tanto, los efectos de un tratamiento sobre este son especialmente relevantes.

3.5. Análisis de costos

Se denota que el precio más conveniente corresponde al H₂O₂ a pesar de ser el que se requiere en mayor cantidad. Además, aunque el NaOH tenga en menor precio por Kg, debido a que se emplea una mayor cantidad, resulta más conveniente adquirir el KOH.

Tabla 3.5.1 Precios de reactivos obtenidos de cotización con proveedores.

Reactivos	Cantidad de reactivo por muestreo (mL)	Cantidad neta de reactivo por muestreo	Precio de reactivo	Precio de reactivos por muestreo (\$)
KOH	480	152.64 g	\$46/Kg	7.02
NaOH	480	270.72 g	\$30/Kg	8.12
H ₂ O ₂	480	864 mL	\$5.35/L	4.62

3.6. Evaluación de desempeño de cada reactivo

El análisis cualitativo de desempeño ayudará a resumir las mejores cualidades de cada reactivo con el fin de seleccionar al químico más adecuado. Esta información se detalla en la Tabla 3.6.1 y en la Figura 3.6.1.

Tabla 3.6.1 Evaluación cualitativa de desempeño de cada reactivo.

Reactivo	Mejor precio	Capacidad de digestión ¹	Facilidad de visualización ²	Conservación de muestra ³	Conservación de superficie del plástico
H ₂ O ₂	5	5	1	3	5
NaOH	3	3	5	5	2
KOH	4	4	4	5	4

Debido a que no se encontraron diferencias de significancia estadística, se califica de acuerdo con los porcentajes de tejido digerido obtenidos. Esta calificación se basa en factores como: alteración a la forma de la partícula, coloración y presencia de residuos de tejido. Se refiere a las partículas completas pérdidas durante implementación del reactivo.

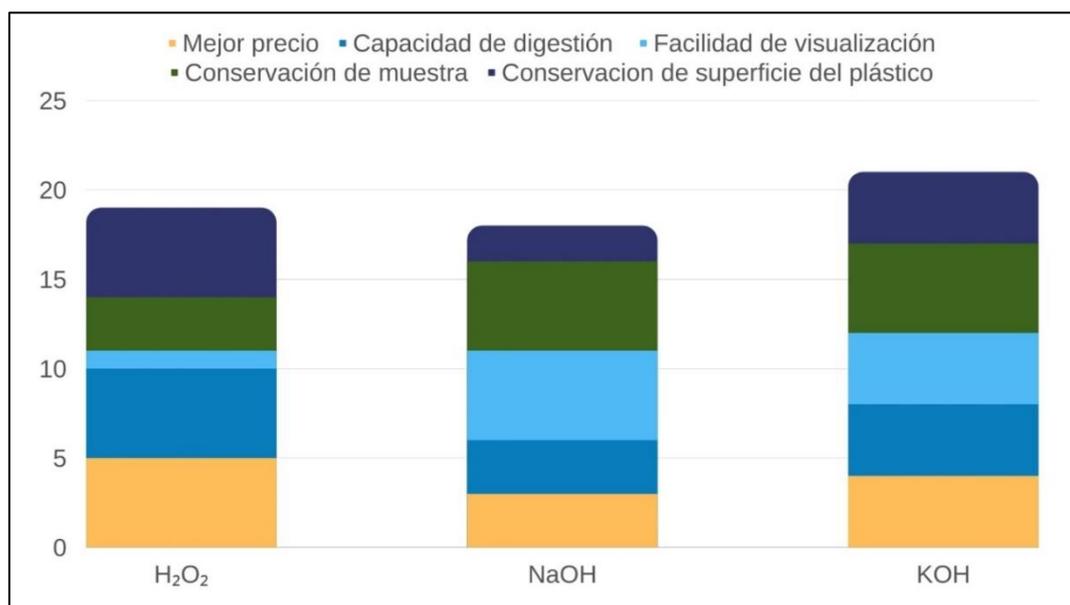


Figura 3.6.1 Representación gráfica de la evaluación cualitativa de desempeño de cada reactivo.

CAPÍTULO 4

4. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

4.1. Conclusiones

No se detectaron diferencias significativas en cuanto a la capacidad de digestión y conservación de la muestra medidas por tejido blando digerido y pérdida de peso de partículas plásticas después de someter a tratamientos, por lo tanto, se emplearon otros indicadores para seleccionar al reactivo más adecuado.

Los tres reactivos mostraron un desempeño bastante bueno en cuanto a digestión de tejido blando. A pesar de los beneficios que el H_2O_2 tuvo en el costo y su capacidad de conservación de la superficie de las partículas de plástico, la reacción química que ligeramente produce burbujas influyó en pérdida de partículas completas de la muestra.

Por otro lado, a pesar de la excelente capacidad de visualización obtenida a partir de la implementación de NaOH, este reactivo no representó una ventaja en precio y no tuvo un buen desempeño en cuanto a la conservación de la superficie de la muestra, siendo esto de gran relevancia ya que demostró provocar una reacción corrosiva que podría significar la pérdida de partículas completas si se trabaja con MPs más pequeños.

Los resultados demuestran que el KOH presentó un mejor desempeño ya que no dañó la superficie de la muestra, tuvo precio conveniente y su implementación permitió una buena facilidad de visualización.

4.2. Recomendaciones

Se recomienda considerar otros métodos para destruir el tejido que actúen como pretratamiento, como, por ejemplo: la congelación de muestras para una mayor destrucción celular o agitación leve durante la digestión como potenciador mediante la desagregación mecánica del tejido y contacto con los agentes químicos.

Se propone para futuras evaluaciones el uso de partículas de nylon debido a su abundancia en el ambiente y tamaño, teniendo en cuenta la dificultad de manipulación de este tipo de partículas.

Se debe considerar que un aumento de concentración o el uso de un reactivo inadecuado puede significar la pérdida de partículas, especialmente de fibras de nylon y conducir a la subestimación de MPs en muestras de mejillones.

Finalmente, se sugiere el aumento de réplicas con la finalidad de proveer una muestra de mayor tamaño para obtener datos de significancia estadística.

BIBLIOGRAFÍA

- Barnes, D. K. A., Galgani, F., Thompson, R. C., & Barlaz, M. (2009). Accumulation and fragmentation of plastic debris in global environments. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 364(1526), 1985–1998.
<https://doi.org/10.1098/rstb.2008.0205>
- Boots, B., Russell, C. W., & Green, D. S. (2019). Effects of Microplastics in Soil Ecosystems: Above and below Ground. *Environmental Science and Technology*, 53(19), 11496–11506. <https://doi.org/10.1021/acs.est.9b03304>
- Carlson, A. (2009). Plastics and sustainability. *Society of Plastics Engineers - International Polyolefins Conference - FLEXPACKCON 2009*, 3, 1653–1689.
https://doi.org/10.1007/978-3-030-68472-3_9
- Catarino, A. I., Thompson, R., Sanderson, W., & Henry, T. B. (2017). Development and optimization of a standard method for extraction of microplastics in mussels by enzyme digestion of soft tissues. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 36(4), 947–951. <https://doi.org/10.1002/etc.3608>
- Claessens, M., Van Cauwenberghe, L., Vandegehuchte, M. B., & Janssen, C. R. (2013). New techniques for the detection of microplastics in sediments and field collected organisms. *Marine Pollution Bulletin*, 70(1–2), 227–233.
<https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2013.03.009>
- Cole, M., Webb, H., Lindeque, P. K., Fileman, E. S., Halsband, C., & Galloway, T. S. (2014). Isolation of microplastics in biota-rich seawater samples and marine organisms. *Scientific Reports*, 4. <https://doi.org/10.1038/SREP04528>
- De Witte, B., Devriese, L., Bekaert, K., Hoffman, S., Vandermeersch, G., Cooreman, K., & Robbens, J. (2014). Quality assessment of the blue mussel (*Mytilus edulis*): Comparison between commercial and wild types. *Marine Pollution Bulletin*, 85(1), 146–155. <https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2014.06.006>
- Diaz-Basantes, M. F., Conesa, J. A., & Fullana, A. (2020). Microplastics in honey, beer, milk and refreshments in Ecuador as emerging contaminants. *Sustainability (Switzerland)*, 12(12). <https://doi.org/10.3390/SU12145514>
- Diaz-Basantes, M. F., Nacimba-Aguirre, D., Conesa, J. A., & Fullana, A. (2022).

- Presence of microplastics in commercial canned tuna. *Food Chemistry*, 385(March), 132721. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2022.132721>
- Ding, J., Sun, C., He, C., Li, J., Ju, P., & Li, F. (2021). Microplastics in four bivalve species and basis for using bivalves as bioindicators of microplastic pollution. *Science of the Total Environment*, 782, 146830. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2021.146830>
- Ding, J., Sun, Y., He, C., Li, J., & Li, F. (2022). Towards Risk Assessments of Microplastics in Bivalve Mollusks Globally. *Journal of Marine Science and Engineering*, 10(2). <https://doi.org/10.3390/jmse10020288>
- Geyer, R., Jambeck, J. R., & Law, K. L. (2017). Production, use, and fate of all plastics ever made. *Science Advances*, 3(7), 3–8. <https://doi.org/10.1126/sciadv.1700782>
- Horstman, E. M., Dohmen-Janssen, C. M., Narra, P. M. F., van den Berg, N. J. F., Siemerink, M., & Hulscher, S. J. M. H. (2014). Wave attenuation in mangroves: A quantitative approach to field observations. *Coastal Engineering*, 94, 47–62. <https://doi.org/10.1016/j.coastaleng.2014.08.005>
- Hu, B., Guo, P., Han, S., Jin, Y., Nan, Y., Deng, J., He, J., Wu, Y., & Chen, S. (2022). Distribution characteristics of microplastics in the soil of mangrove restoration wetland and the effects of microplastics on soil characteristics. *Ecotoxicology*, 31(7), 1120–1136. <https://doi.org/10.1007/s10646-022-02561-3>
- Hurley, R. R., & Nizzetto, L. (2018). Fate and occurrence of micro(nano)plastics in soils: Knowledge gaps and possible risks. *Current Opinion in Environmental Science and Health*, 1, 6–11. <https://doi.org/10.1016/j.coesh.2017.10.006>
- Koelmans, A. A., Mohamed Nor, N. H., Hermsen, E., Kooi, M., Mintenig, S. M., & De France, J. (2019). Microplastics in freshwaters and drinking water: Critical review and assessment of data quality. *Water Research*, 155, 410–422. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2019.02.054>
- Leslie, H. A., van Velzen, M. J. M., Brandsma, S. H., Vethaak, A. D., Garcia-Vallejo, J. J., & Lamoree, M. H. (2022). Discovery and quantification of plastic particle pollution in human blood. *Environment International*, 163(December 2021), 107199. <https://doi.org/10.1016/j.envint.2022.107199>

- Li, Y., Zhang, Y., Chen, G., Xu, K., Gong, H., Huang, K., Yan, M., & Wang, J. (2021). Microplastics in surface waters and sediments from Guangdong coastal areas, South China. *Sustainability (Switzerland)*, *13*(5), 1–15.
<https://doi.org/10.3390/su13052691>
- Materić, D., Kjær, H. A., Vallelonga, P., Tison, J. L., Röckmann, T., & Holzinger, R. (2022). Nanoplastics measurements in Northern and Southern polar ice. *Environmental Research*, *208*(November 2021).
<https://doi.org/10.1016/j.envres.2022.112741>
- Mathalon, A., & Hill, P. (2014). Microplastic fibers in the intertidal ecosystem surrounding Halifax Harbor, Nova Scotia. *Marine Pollution Bulletin*, *81*(1), 69–79.
<https://doi.org/10.1016/J.MARPOLBUL.2014.02.018>
- NOAA. (n.d.). *NOAA Mussel Watch Program: An Assessment of Contaminants of Emerging Concern in Chesapeake Bay, MD, and Charleston Harbor, SC - NCCOS Coastal Science Website*. Retrieved November 22, 2022, from <https://coastalscience.noaa.gov/project/mussel-watch-program-assessment-chesapeake-bay-charleston-harbor/>
- Of, E., The, M. I. N., & Assessment, A. G. (n.d.). *Science for Sustainable Oceans*. www.imo.org
- Paredes, M., Castillo, T., Viteri, R., Fuentes, G., & Boderó, E. (2019). Microplastics in the drinking water of the Riobamba city, Ecuador. *Scientific Review Engineering and Environmental Sciences*, *28*(4), 653–663.
<https://doi.org/10.22630/PNIKS.2019.28.4.59>
- Presence of microplastics and nanoplastics in food, with particular focus on seafood. (2016). *EFSA Journal*, *14*(6). <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2016.4501>
- Qi, Y., Yang, X., Pelaez, A. M., Huerta Lwanga, E., Beriot, N., Gertsen, H., Garbeva, P., & Geissen, V. (2018). Macro- and micro- plastics in soil-plant system: Effects of plastic mulch film residues on wheat (*Triticum aestivum*) growth. *Science of the Total Environment*, *645*, 1048–1056. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2018.07.229>
- Ragusa, A., Notarstefano, V., Svelato, A., Belloni, A., Gioacchini, G., Blondeel, C., Zucchelli, E., De Luca, C., D'avino, S., Gulotta, A., Carnevali, O., & Giorgini, E.

- (2022). Raman Microspectroscopy Detection and Characterisation of Microplastics in Human Breastmilk. *Polymers*, 14(13), 1–14.
<https://doi.org/10.3390/polym14132700>
- Rillig, M. C., Ziersch, L., & Hempel, S. (2017). Microplastic transport in soil by earthworms. *Scientific Reports*, 7(1), 1–6. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-01594-7>
- Rochman, C. M., Tahir, A., Williams, S. L., Baxa, D. V., Lam, R., Miller, J. T., Teh, F. C., Werorilangi, S., & Teh, S. J. (2015). Anthropogenic debris in seafood: Plastic debris and fibers from textiles in fish and bivalves sold for human consumption. *Scientific Reports*, 5(September), 1–10. <https://doi.org/10.1038/srep14340>
- Roy, P., Mohanty, A. K., & Misra, M. (2022). Microplastics in ecosystems: their implications and mitigation pathways. *Environmental Science: Advances*, 1(1), 9–29. <https://doi.org/10.1039/d1va00012h>
- Vethaak, A. D., & Leslie, H. A. (2016). Plastic Debris is a Human Health Issue. *Environmental Science and Technology*, 50(13), 6825–6826.
<https://doi.org/10.1021/acs.est.6b02569>
- Wagner, M., & Lambert, S. (2018). *Freshwater Microplastics - The Handbook of Environmental Chemistry* 58. <https://doi.org/10.1007/978-3-319-61615-5>
- Wood, L. (2021). Global Plastic Recycling Market Report 2021: Market to Reach \$47.3 Billion by 2026 from \$33 Billion in 2020 - ResearchAndMarkets.com. In *ResearchAndMarkets.com*.
<https://www.businesswire.com/news/home/20211130005878/en/Global-Plastic-Recycling-Market-Report-2021-Market-to-Reach-47.3-Billion-by-2026-from-33-Billion-in-2020---ResearchAndMarkets.com>
- XiaoZhi, L. (2021). Microplastics are everywhere-but are they harmful? *Nature*, 22–25.
- Zhang, S., Yang, X., Gertsen, H., Peters, P., Salánki, T., & Geissen, V. (2018). A simple method for the extraction and identification of light density microplastics from soil. *Science of the Total Environment*, 616–617, 1056–1065.
<https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2017.10.213>
- Zhu, L., Zhu, J., Zuo, R., Xu, Q., Qian, Y., & AN, L. (2023). Identification of microplastics

in human placenta using laser direct infrared spectroscopy. *Science of The Total Environment*, 856(September 2022), 159060.

<https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2022.159060>

Ziajahromi, S., Neale, P. A., Telles Silveira, I., Chua, A., & Leusch, F. D. L. (2021). An audit of microplastic abundance throughout three Australian wastewater treatment plants. *Chemosphere*, 263, 128294.

<https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2020.128294>

APÉNDICES

APÉNDICE A

Prueba de normalidad Shapiro-Wilk para datos de capacidad de digestión

Hipótesis	H₀: La muestra proviene de una distribución normal. H₁: La muestra no proviene de una distribución normal
Nivel de significancia	α: 0,05
Conclusión	A partir del cálculo de un valor p de 0.97888, con un nivel de confianza del 95% no se rechaza que la muestra provenga de una distribución normal.

APÉNDICE B

Prueba de homogeneidad de varianzas para datos de capacidad de digestión

Hipótesis	H₀ : Las varianzas son iguales. H₁ : Al menos una varianza es diferente.
Nivel de significancia	α : 0,05
Conclusión	A partir del cálculo de un valor p de 0.68068, con un nivel de confianza del 95% no se rechaza que las varianzas de los tres grupos son iguales.

APÉNDICE C

ANOVA de una vía con comparación múltiple de Tukey para datos de capacidad de digestión

Hipótesis	H₀: $\mu_i = \mu_j$ H₁: $\mu_i \neq \mu_j$, para todo $i \neq j$
Nivel de significancia	α: 0,05
Conclusión	Con un 95% de confianza, no se rechaza la hipótesis nula, es decir, las medias pueden ser consideradas iguales.

APÉNDICE D

Prueba de normalidad Shapiro-Wilk para datos de pérdida de muestra (MP)

Hipótesis	H₀: La muestra proviene de una distribución normal. H₁: La muestra no proviene de una distribución normal
Nivel de significancia	α: 0,05
Conclusión	Con un nivel de confianza del 95%, se rechaza que los datos provengan de una distribución normal.

Prueba de Kruskal-Wallis para datos de pérdida de muestra (MP)

Hipótesis	H₀: $\mu_{1/2i} = \mu_{1/2j}$ H₁: $\mu_{1/2i} \neq \mu_{1/2j}$, para todo $i \neq j$
Nivel de significancia	α: 0,05
Conclusión	Con un nivel de confianza del 95%, no se rechaza la hipótesis nula.