

La investigación reportada en esta tesis es parte de los programas de investigación del CICESE (Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada, Baja California).

La investigación fue financiada por el CONAHCYT (Consejo Nacional de Humanidades, Ciencias y Tecnologías).

Todo el material contenido en esta tesis está protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México). El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo o titular de los Derechos de Autor.

**Centro de Investigación Científica y de Educación
Superior de Ensenada, Baja California**



**Maestría en Ciencias
en Ecología Marina**

**Desarrollo y evaluación de la metodología de extracción de
microplásticos en sedimentos marinos**

Tesis
para cubrir parcialmente los requisitos necesarios para obtener el grado de
Maestra en Ciencias

Presenta:

María Elena Velázquez Ferrera

Ensenada, Baja California, México
2024

Tesis defendida por
María Elena Velázquez Ferrera

y aprobada por el siguiente Comité

Dr. Juan Carlos Herguera García
Director de tesis

Dra. María Lucila del Carmen Lares Reyes

Dr. Jesús Arturo Martín Barajas

Dr. Misael Díaz Asencio



Dr. Rafael Andrés Cabral Tena
Coordinador del Posgrado en Ecología Marina

Dra. Ana Denise Re Araujo
Directora de Estudios de Posgrado

Resumen de la tesis que presenta **María Elena Velázquez Ferrera** como requisito parcial para la obtención del grado de Maestra en Ciencias en Ecología Marina

Desarrollo y evaluación de la metodología de extracción de microplásticos en sedimentos marinos

Resumen aprobado por:

Dr. Juan Carlos Herguera García
Director de tesis

La evaluación del impacto de la contaminación por plásticos en el medio marino ha impulsado la investigación sobre la distribución de microplásticos en la columna de agua y en los sedimentos marinos en las últimas décadas. Tenemos cada vez mayor número de estudios en los ambientes costeros y cercanos a los continentes, y prácticamente ninguno en los sedimentos marinos profundos, especialmente del golfo de México. Razón por la que este trabajo se centró en desarrollar y evaluar una metodología adaptada a las necesidades específicas de las muestras de sedimentos de aguas profundas del golfo de México. Este trabajo se realizó en colaboración con el Laboratorio de Estudios del Medio Ambiente Marino de la Agencia Internacional de Energía Atómica en Mónaco, que proporcionó la metodología REMARCO y muestras de referencia con microesferas de polietileno fluorescente de tamaño entre 32 y 38 μm Cospheric®. Los resultados preliminares mostraron recuperaciones muy bajas por lo que se procedió a realizar varios cambios secuenciales en la metodología de extracción que dieron como resultado una mayor recuperación de microplásticos. Las primeras extracciones dieron un $10\% \pm 3\%$ de recuperación usando la metodología REMARCO, hasta llegar a un $89\% \pm 6\%$ en las extracciones realizadas tras varios cambios en la metodología, y la preparación de muestras en el laboratorio con sedimentos de mar profundo del GM a las que se añadieron 50 microesferas de polietileno de 34 a 40 μm Cospheric®. Se concluyó que hay varios factores influyen en la recuperación de microplásticos, destacando el uso de centrifugación para la separación por densidad, múltiples extracciones con soluciones salinas saturadas (2 con NaCl y 4 con NaI), el uso de surfactantes como Tritón™ X-100, y el enjuague sistemático con agua desionizada del material de vidrio utilizado.

Palabras clave: microplásticos, metodología, separación por densidad, sedimentos marinos

Abstract of the thesis presented by **María Elena Velázquez Ferrera** as a partial requirement to obtain the Master of Science degree in Marine Ecology

Development and evaluation of the methodology for extraction of microplastics in marine sediments

Abstract approved by:

Dr. Juan Carlos Herguera García
Thesis Director

Assessment of the impact of plastic pollution in the marine environment has driven research on the distribution of microplastics in the water column and marine sediments in recent decades. We have an increasing number of studies in coastal environments and close to continents, and practically none in deep marine sediments, especially from the Gulf of Mexico. Therefore, this work focused on developing and evaluating a methodology tailored to the specific needs of samples from the Gulf of Mexico. This work was conducted in collaboration with the Marine Environmental Studies Laboratory of the International Atomic Energy Agency in Monaco, which provided the REMARCO methodology and reference samples with fluorescent polyethylene microspheres sized between 32 and 38 μm (Cospheric®). Preliminary results showed very low recoveries, which led us to implement several sequential changes to the extraction methodology that resulted in greater recovery of microplastics. The first extractions gave a $10\% \pm 3\%$ recovery using the REMARCO methodology, reaching $89\% \pm 6\%$ in the extractions carried out after several changes in the methodology, and the preparation of samples in the laboratory with deep sea sediments of the GM to which 50 Cospheric® polyethylene microspheres of 34 to 40 μm were added. We conclude that several factors influenced the additional recovery of microplastics. Key aspects include the use of centrifugation for density separation, multiple extractions with saturated saline solutions (2 with NaCl and 4 with NaI), the use of surfactants such as Triton™ X-100, and the systematic rinsing the glassware used with deionized water.

Keywords: microplastics, methodology, density separation, marine sediments

Dedicatoria

A mi familia, a la que me vio crecer y a la que yo elegí. Sin su apoyo no lo hubiera logrado.

Agradecimientos

Al Consejo Nacional de Humanidades, Ciencias y Tecnologías (CONAHCyT) por la beca que me brindó para realizar mis estudios de Maestría (**CVU 1131330**), así como al Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada, Baja California (CICESE) y al Posgrado en Ecología Marina (PEM) por aceptarme y permitirme desarrollar esta investigación en el Laboratorio de Paleoceanografía, Paleoclimatología y Paleoecología.

Al Laboratorio de Estudios del Medio Ambiente Marino (MEL) de la Agencia Internacional de Energía Atómica (IAEA) en Mónaco y al Dr. Carlos M. Alonso Hernández por su colaboración y aportaciones a este proyecto.

Al Dr. Juan Carlos Herguera García por abrirme las puertas de su laboratorio, por todo el aprendizaje que me brindó en estos años, por no rendirse conmigo por más compleja que fuera la situación, por acompañarme en cada paso y por el infinito apoyo brindado a lo largo del arduo trabajo realizado para llegar a la culminación de la tesis.

A mi comité de tesis, la Dra. María Lucila del Carmen Lares Reyes, el Dr. Jesús Arturo Martín Barajas y el Dr. Misael Díaz Asencio, por acompañarme en cada paso de la elaboración de este proyecto, por todo su tiempo invertido y los consejos brindados. Ustedes fueron los testigos de los retos enfrentados y mi primer apoyo para navegar este desafío académico.

A la M. en C. Doreny Guadalupe Bobadilla Gamez, técnico del laboratorio de Paleoceanografía, Paleoclimatología y Paleoecología, por el apoyo incondicional, por todo lo que me enseñó, por todo lo que compartimos, por sus regaños bien merecidos y sus palabras de aliento cuando más las necesitaba, por no dejarme sola nunca y por siempre haber estado dispuesta a resolver a mi lado el sin fin de retos que se nos presentaron aun cuando tenía mil pendientes más que atender y por siempre defenderme en cualquier situación.

A todos los académicos del Posgrado en Ecología Marina, por la sabiduría impartida en las aulas y en el campo, particularmente al doctor Luis Eduardo Calderón Aguilar, que me recibió en su laboratorio como una integrante más y estuvo siempre dispuesto a apoyarme.

A Mildred, Lili y Sandra por ser mis compañeras más fieles, por el trabajo en equipo que siempre hicimos para cumplir juntas nuestras metas, por todas las mañanas con café, los días ocupados pero

compartidos y las noches de desvelo en el laboratorio o alejándonos del estrés. Por estar siempre para mí más allá de lo académico, fueron mis pilares y mi familia lejos de mi casa y las llevaré siempre en mi corazón.

A todos mis amigos de CICESE, de Ensenada y a los que me acompañaron a la distancia, a Grecia, Rodri, Manu, Mau, Jacquez, Cano, Jessy, Felipe, Andrés, Frida, Arturo, Wen e incontables personas que me dieron palabras de aliento y ánimos para dar lo mejor de mí. Gracias por estar.

A mis familiares, por preocuparse por mí, por echarme siempre porras, por su todo su apoyo y por todo su cariño.

A mi hermano, Maggie, Dante y Luca por preocuparse siempre por mí y tenerme en sus pensamientos y sobre todo por sus abrazos cálidos.

A Honey y Moka que llenan mi vida de luz.

A mis papás que me dieron todo su apoyo sin límites para que siguiera desarrollándome profesionalmente y creciendo personalmente, que me dieron las alas para volar y que me inspiraron a llegar alto y ser siempre la mejor versión de mí misma y por su amor infinito.

A Andrea, por ser mi mejor amiga, mi compañera de vida y mi más grande motivación, por que has estado conmigo desde el principio en las buenas y en las malas, por tus palabras de aliento, por saber escucharme y saber aconsejarme, por tu apoyo infinito e incondicional, sin ti esto no sería posible, gracias por todo.

Tabla de contenido

	Página
Resumen en español.....	ii
Resumen en inglés.....	iii
Dedicatoria	iv
Agradecimientos.....	v
Lista de figuras.....	viii
Lista de tablas	ix
Capítulo 1. Introducción	1
1.1 Antecedentes	1
1.2 Justificación	7
1.3 Objetivos	8
1.3.1 Objetivo general	8
1.3.2 Objetivos específicos.....	8
Capítulo 2. Metodología	9
2.1 Preparación de muestras de sedimento con microplásticos añadidos.....	9
2.2 Extracción de microplásticos.....	10
2.2.1 Metodología de propuesta por REMARCO	10
2.2.2 Diseño experimental y metodología propuesta.....	12
Capítulo 3. Resultados.....	17
3.1 Resultados generales	17
3.2 Análisis estadístico	20
Capítulo 4. Discusión	24
Capítulo 5. Conclusiones.....	30
Literatura citada	32
Anexos	35

Lista de figuras

Figura	Página
Figura 1 Ubicación geográfica del Golfo de México, estados costeros, plataformas continentales e isóbatas de profundidad correspondientes a 25, 50, 100, 500, 1000, 2500, 3000 y 3500 m. Tomada del Tomo II - Circulación oceánica y oleaje del ATLAS de línea base del Golfo de México (Herzka et al., 2021).	4
Figura 2 Representación gráfica por pasos del procedimiento de preparación de sedimentos con una cantidad de microplásticos conocida para determinar el porcentaje final de recuperación tras someterlas a la metodología propuesta (Imagen elaborada utilizando el software de imagen e ilustración científica BioRender)	9
Figura 3 Diagrama de flujo del procedimiento detallado en el Protocolo la Determinación de Abundancia de Microplásticos en Núcleos Sedimentarios propuesto por la Red de Investigación Marino-Costera (REMARCO).	11
Figura 4 Diagrama de flujo del diseño experimental para la metodología propuesta, en la cual se resaltan los pasos en los cuales se introdujeron las variaciones.	13
Figura 5 Sistema de filtrado propuesto en este trabajo para la etapa de filtración del protocolo de extracción de microplásticos en sedimentos marinos por diferencia de densidades (Imagen elaborada utilizando el software de imagen e ilustración científica BioRender)	15
Figura 6 Representación gráfica de la metodología llevada a cabo en este trabajo, en donde se detallan todos los pasos de forma visual, marcando con negritas el texto de los pasos en los cuales se realizaron las comparativas de condiciones, la sal utilizada en la solución saturada, el surfactante a utilizar y la cantidad de extracciones (Imagen elaborada utilizando el software de imagen e ilustración científica BioRender)	16
Figura 7 Evidencia fotográfica de las microesferas de polietileno fluorescente recuperadas en cada filtración de tres muestras correspondientes a tres ensayos distintos a modo de ejemplo, con el conteo de microesferas recuperadas por etapa de filtración de un mismo ensayo, con sus respectivos conteos finales (Fotografías propias tomadas en un estereomicroscopio Leica con una ampliación de X100).....	20
Figura 8 Gráfica de barras de los porcentajes de recuperación de cada ensayo, elaborada con ORIGIN 2018 LABVIEW.....	23
Figura 9 Diagrama de flujo para la metodología para la extracción de microplásticos en sedimentos marinos.....	36

Lista de tablas

Tabla	Página
Tabla 1 Trabajos actuales de recuperación de microplásticos con diferentes metodologías, zonas de estudios, porcentajes de recuperación reportados y rangos de tamaños de microplásticos recuperados, realizados en los últimos doce años.6	6
Tabla 2 Porcentajes de recuperación promedio obtenido de los ensayos progresivos agrupados por las condiciones a las que se llevaron a cabo para la extracción microplásticos, los cuales consistían en una cantidad conocida de microesferas de polietileno fluorescentes únicamente. 18	18
Tabla 3 Porcentajes de recuperación obtenido de los ensayos progresivos agrupados por las condiciones a las que se llevaron a cabo para la extracción de microplásticos, los cuales consistían en una cantidad conocida de microesferas de polietileno fluorescentes y fragmentos de HDPE. ¡Error! Marcador no definido.	¡Error! Marcador no definido.
Tabla 4 Condiciones relevantes de nueve de los trece ensayos realizados para extraer microesferas de polietileno fluorescentes, en el software estadístico Origin, evaluados por medio de ANOVA y prueba Post Hoc de Tukey 21	21
Tabla 5 Resultados del ANOVA en el cual se comparan las medias de ocho de los trece ensayos realizados para extraer microesferas de polietileno fluorescentes de sedimentos marinos, obtenidos con ORIGIN 2018 LABVIEW. 21	21
Tabla 6 Resultados de la prueba post hoc de Tukey de nueve de los trece ensayos realizados para extraer microesferas de polietileno fluorescentes de sedimentos marinos, en donde los valores de Sig. iguales a 1 indican los ensayos que son significativamente diferentes, obtenidos con ORIGIN 2018 LABVIEW. 22	22

Capítulo 1. Introducción

La contaminación por microplásticos se ha convertido en un problema a nivel global debido a que afecta diversos ecosistemas y ha provocado impactos considerables en el medio ambiente y en la salud humana (Napper & Thompson, 2020). Por lo que resulta crucial desarrollar métodos confiables y específicos para la detección y cuantificación de microplásticos en diferentes matrices ambientales. Debido a su bajo costo y maleabilidad, el plástico es uno de los materiales más usados en diversas áreas industriales. Se estima que el aporte anual promedio de plástico al océano es de más de 10 millones de toneladas, cifra que podría aumentar hasta 33 mil millones de toneladas para 2050 si su producción mantiene su tasa de consumo actual (Enet, 2022). El plástico que ingresa a los océanos se degrada por diferentes procesos biogeoquímicos, físicos y biológicos, fragmentándose en microplásticos, comúnmente definidos como partículas de tamaño de 5 mm a 1 μ m (Simon-Sánchez et al., 2019) (Niu et al., 2023). Este incremento de microplásticos en los océanos se atribuye al mal manejo de residuos en zonas costeras industrializadas y altamente pobladas, como es el caso de diversas zonas costeras como el Golfo de México. Su presencia en el medio ambiente marino impacta a los ecosistemas que sustenta, ocasiona problemas de salud pública poco conocidos y tiene efectos adversos en los costos socioeconómicos (Grelaud & Ziveri, 2020). Se ha reportado la presencia de micro plásticos en cuerpos de agua dulce, estuarios y lagos, así como en ecosistemas marinos desde la costa hasta las aguas superficiales oceánicas, pero aún se desconoce sobre su distribución en los fondos oceánicos a profundidades mayores de 200 m (Simon-Sánchez et al., 2019). Aunado a esto, las diversas metodologías actuales para la extracción y cuantificación de microplásticos se encuentran en fase de desarrollo y se centran en diferentes matrices ambientales. Muchos estudios publicados no reportan porcentajes de recuperación, lo que dificulta su cuantificación, y hay muy pocas calibraciones entre laboratorios para establecer la precisión de las diferentes extracciones de microplásticos reportadas. Lo anterior resalta la relevancia de establecer una metodología eficiente para extraer microplásticos de muestras únicas y costosas, como los núcleos de sedimentos marinos profundos.

1.1 Antecedentes

1.1.1 Microplásticos

Las partículas de plástico se clasifican como nanoplásticos de tamaño menor a 1 micra (<1 μ),

microplásticos de 1 μ a 5mm, mesoplásticos de 5 a 50 mm, macroplásticos de 50 mm a 50 cm y megaplásticos mayores a 50 cm (Pham et al., 2021). En este trabajo se enfoca exclusivamente en microplásticos menores de 335 micras, debido a su posible acumulación en el fondo marino. Son de gran relevancia debido a su baja tasa de degradación en el ambiente marino y en los sedimentos, lo que potencialmente puede ocasionar impactos negativos al ecosistema marino y a la salud humana (Hopewell et al., 2009).

Para comprender mejor la naturaleza de los microplásticos, es importante mencionar que se clasifican según su producción ya sea primaria o secundaria. Los primeros corresponden a los manufacturados de este tamaño. Los secundarios son producto de la degradación de plásticos de mayor tamaño y a su vez se clasifican en función de su forma (Coppock et al., 2017). Los microplásticos primarios por lo general son producidos en forma de pellets, esferas u hojuelas, y se encuentran principalmente en productos de higiene personal o belleza como exfoliantes, pasta de dientes, y como fibras y espumas fragmentadas. Los plásticos secundarios se encuentran como fragmentos heterogéneos que pueden ir desde trozos irregulares hasta partículas descompuestas conformadas como pellets debido a los distintos procesos de degradación (Pham et al., 2021; Waldschläger et al., 2022).

En cuanto a sus características químicas, los plásticos son polímeros formados por largas cadenas de monómeros, derivados del petróleo. Son materiales ligeros, duraderos y, de bajo costo de producción y sobre todo resistentes. Estas mismas características que los hacen atractivos para la industria y la manufactura, son también las que los hacen difícil de disponer o reciclar (Napper & Thompson, 2020). Existe una amplia variedad de polímeros utilizados en diversas industrias según sus características, los más comúnmente utilizados son el polietileno (PE) y el polipropileno (PP) (Andrady & Neal, 2009), aunque también son de gran importancia compuestos como: poliamida (PA), cloruro de polivinilo (PVC), tereftalato de polietileno (PET), polietileno de alta densidad (HDPE), polietileno de baja densidad (LDPE) y poliuretano (PUR). Este trabajo se enfocó principalmente en el Polietileno como plástico problema ya que es el polímero más abundante, con una producción global estimada de aproximadamente 157 millones de toneladas en el año 2023 (Mufarrij et al., 2023). Principalmente se usa para envasar productos de corta vida útil como bolsas, botellas, vasos y recipientes de almacenamiento (Oliveira et al., 2020).

El problema de la contaminación por plástico ha impulsado propuestas como lo es su reciclaje, pero desafortunadamente, aunque el plástico en general se considera un material reciclable, no todos los tipos lo son y poco se sabe sobre los porcentajes reales del plástico que se recicla y el que termina en rellenos sanitarios, vertederos o en los ecosistemas. Sin embargo, se sabe con certeza que la principal causa de su

ingreso a los océanos es debido a su mal manejo (Grelaud & Ziveri, 2020). Una vez que el plástico deja de ser de utilidad y se deshecha comienza su descomposición, pasando por distintos procesos de degradación, como consecuencia del intemperismo físico, químico o microbiológico, lo que provoca su fragmentación.

1.1.2 Transporte vertical en el océano

El ingreso de microplásticos al océano ocurre principalmente a través de los ríos que desembocan al océano (Waldschläger et al., 2022) y debido a la baja densidad de estos compuestos, los plásticos que ingresan al océano tienden a permanecer en la superficie y ser transportados por las corrientes, hasta acumularse en puntos de aglomeración (Van Sebille et al., 2020). Este es un fenómeno que se ha comenzado a estudiar más a fondo en años recientes, sin embargo, poco se sabe acerca de su transporte hacia aguas marinas más profundas.

Los microplásticos debido a su tamaño y densidad, dependerán de otros procesos que provoquen que su densidad sea mayor a la del agua y se transporten a través de la columna de agua. Un factor que influye en el transporte vertical es la forma de estas partículas, principalmente como pellets una vez que han sido ingeridas por organismos heterótrofos como el zooplancton, lo cual facilita su exportación al mar profundo y eventualmente su acumulación en los sedimentos (Waldschläger et al., 2022). La formación de pellets fecales, incluye la degradación, agregación y bioincrustación (Rogers et al., 2020). Tanto la agregación como la formación de aglomerados con materia orgánica o microorganismos provocan la disminución de la flotabilidad permitiendo que las partículas de microplásticos en forma de pellets precipiten y puedan ingresar a zonas marinas más profundas.

Este proceso de deposición de los microplásticos en forma de pellets podría afectar directamente a los ecosistemas benthicos, ya que se estima que aproximadamente el 70% de la basura marina termina en el lecho marino (Coppock et al., 2017). Sin embargo, no se debe perder de vista que la presencia de los microplásticos en sedimentos marinos dependerá fuertemente de las condiciones del lecho marino, como su ubicación geográfica, la profundidad y las corrientes (Bellasi et al., 2021). Es decir que se debe considerar que los ecosistemas someros son los más afectados por la presencia de microplásticos y los de más fácil acceso para su estudio y análisis, mientras que la llanura abisal es un ecosistema que representa grandes distancias de transporte vertical de partículas y es un ecosistema de difícil acceso para la investigación científica. Es por estas dificultades que se requieren metodologías que nos permitan analizar

con certeza las muestras que se pueden coleccionar de los lechos marinos profundos.

1.1.3 Golfo de México

El área de estudio de interés para este trabajo son los sedimentos del talud y de la llanura abisal del Golfo de México. El Consorcio de Investigaciones del Golfo de México (CiGoM) coleccionó varios núcleos de sedimentos en las aguas profundas del Golfo de México en distintas campañas oceanográficas (Díaz-Asencio et al., 2019). Estos núcleos gran valor académico presentan una oportunidad única para analizar la presencia de microplásticos en el lecho marino. El Golfo de México es una región de gran interés respecto a la contaminación de plástico debido su ubicación geográfica y la presencia de varios centros urbanos cercanos al litoral, que lo hacen susceptible a la entrada de plásticos y microplásticos. Además de ser una zona de gran interés comercial e industrial por su alta actividad petrolera y pesquera desde los años cincuenta (Murawski et al., 2020).

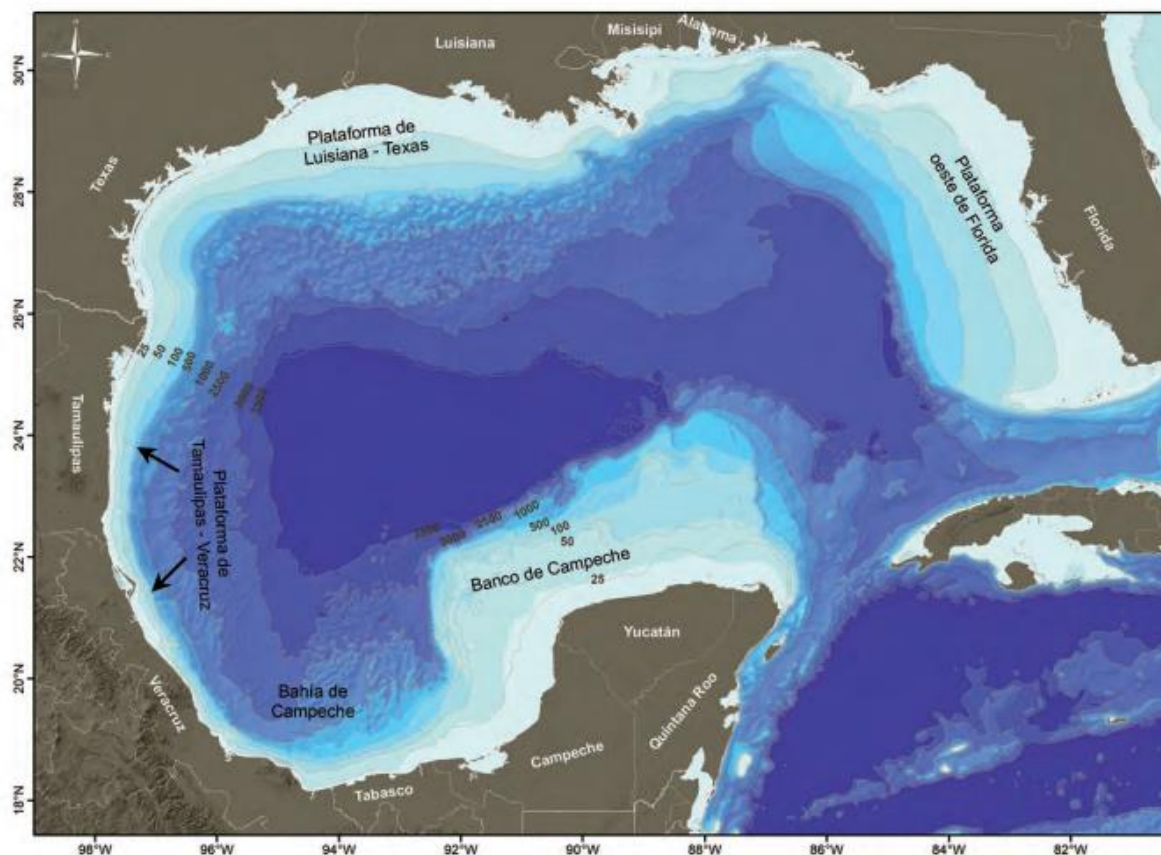


Figura 1 Ubicación geográfica del Golfo de México, estados costeros, plataformas continentales e isóbatas de profundidad correspondientes a 25, 50, 100, 500, 1000, 2500, 3000 y 3500 m. Tomada del Tomo II - Circulación oceánica y oleaje del ATLAS de línea base del Golfo de México (Herzka et al., 2021).

El Golfo de México es una cuenca oceánica con un fondo de bajo relieve por debajo de los 2500 m de profundidad y caracterizado por niveles de baja productividad primaria (Díaz Asencio et al., 2020). Es un mar oligotrófico debido a su baja concentración de nutrientes en la zona fótica (Muller-Karger et al., 2015), y es similar a otras regiones oligotróficas en el océano Atlántico, como es el mar de los Sargazos. Este ecosistema, sin embargo, tiene importantes diferencias por ser un mar interior prácticamente rodeado por el continente, con gradientes batimétricos muy importantes entre la costa y el océano abierto (Herzka et al., 2021) (Figura 1). También tiene una importante actividad de meso escala controlada principalmente por la Corriente del Lazo y los remolinos que esta corriente libera cuasi periódicamente (Martínez-López & Zavala-Hidalgo, 2009).

Aunque existe información sobre el plástico en la superficie de los sedimentos de las zonas costeras, especialmente en la región norte del GM, se desconoce el alcance espacial de la dispersión de los microplásticos en los sedimentos del talud continental y llanura abisal del Golfo de México. Lecke-Mitchell y Mullin (1992) reportaron la presencia de plásticos en el Golfo de México y propusieron un patrón de distribución en las costas de Luisiana.

1.1.4 Metodologías actuales

La creciente preocupación por el impacto ambiental y para la salud asociados a la contaminación por microplásticos ha promovido el desarrollo de metodologías para cuantificar este problema de manera más efectiva. El método más comúnmente utilizado para extraer microplásticos de los sedimentos es la separación por densidad. Este proceso implica añadir una solución de alta densidad a la muestra facilitando la flotación de los microplásticos y su separación del sustrato (X. Zhang et al., 2020b).

Bellasi et al. (2021) desarrollaron una revisión de los trabajos publicados sobre la recuperación de microplásticos en sedimentos marinos. Este trabajo consistió en la recopilación y comparación de las técnicas de extracción propuestas en 49 estudios de 2004 a 2020, centrándose en sedimentos lacustres y marinos. En general, encontraron que el 73.5% de los resultados fueron basados en la separación por densidad, el 10.2% combinó una extracción de aceite de densidad conocida y el restante empleó técnicas de elutriación, separación electrostática y/o despolimerización (Tabla 1).

El análisis de las diferentes metodologías propuestas fue de gran relevancia para comprender el trabajo previo, así como las áreas de estudio en donde existe falta de información. Se observa un gran avance en

cuanto a la detección de microplásticos en zonas someras como playas, ríos y manglares, sin embargo, poco se sabe sobre su distribución en el océano profundo o no se reporta una metodología estandarizada con porcentajes de recuperación. Es por esto que resulta de gran relevancia a considerar la composición particular de las muestras de sedimento de la llanura abisal del Golfo de México, ya que esta difiere de la composición de sedimentos más someros y arenosos de los cuales se han reportado resultados. Estos sedimentos del talud y la planicie abisal son principalmente limos (2 –63 μm) y arcillas (< 2 μm), aunado a esto, al ser una matriz sólida es propensa a envolver a las partículas de microplásticos dificultando su separación (Díaz-Asencio et al., 2019; He et al., 2021).

Tabla 1 Trabajos actuales de recuperación de microplásticos con diferentes metodologías, zonas de estudios, porcentajes de recuperación reportados y rangos de tamaños de microplásticos recuperados, realizados en los últimos doce años.

Método	Reactivos	Zona de estudio	Recuperación reportada	Tamaño de MP recuperados	Autores
Decantación	NaCl NaI	Estuario y playa	35%	<1 mm	Nueva Zelanda (Hidalgo-Ruz et al., 2012)
Decantación modificada	NaCl NaI ZnCl ₂	Río y manglar	99% 40-72%	1 - 5 mm <1 mm	(Imhof et al., 2012; Mohamed Nor & Obbard, 2014)
Separación por densidad	NaI	Sedimentos superficiales y centrales	No se especifica	50 μm - 5 mm	China (Wang et al., 2019)
Separación por densidad	NaCl ZnCl ₂	Sedimentos marinos de playa y lecho	>85%	No se especifica	Portugal (Rivoira et al., 2020)
Separación por densidad asistida por calentamiento	NaH ₂ PO ₄	Sedimentos de playa	93% items/kg d.w.	100 μm - 5 mm	China (Zhang et al., 2020b)
Separación por densidad	NaCl KI	Sedimentos de océano profundo	No se especifica	100 μm - 5 mm	Océano Pacific occidental (Zhang et al., 2020a)

En esta tesis se procedió a comparar las metodologías empleadas en el medio marino en general y en áreas de estudio similares a la llanura abisal y talud continental del Golfo de México. En primera instancia se observó que a pesar de que la separación por densidad es el método más usado, se han propuesto optimizaciones a este método. Hidalgo-Ruz et al., en 2012 propusieron una extracción por decantación que obtuvo un porcentaje de solo 35% de recuperación de microplásticos de menos de 1mm, lo que fue un primer indicador de que la decantación ayuda a la recuperación de partículas de menor tamaño.

En el caso de la decantación modificada (Imhof et al., 2012; Mohamed Nor & Obbard, 2014), se alcanzó un porcentaje de 99% con partículas de 1 a 5mm mientras que para las de tamaño menor a 1mm se obtiene un 40-72%. Estos resultados muestran que los microplásticos de menor tamaño representan un mayor reto para ser extraídas. Se reportan resultados de sedimentos someros (Rivoira et al., 2020; Wang et al., 2019; Zhang et al., 2020a) hasta un trabajo realizado en sedimentos profundos (Zhang et al., 2020a). El método de separación por densidad utiliza distintas sales; como cloruro de sodio (NaCl), yoduro de sodio (NaI), cloruro de zinc ($ZnCl_2$), fosfato monosódico (NaH_2PO_4) y yoduro de potasio (KI).

El análisis de los datos publicados y la necesidad de analizar las muestras de interés proporcionó una base sólida para desarrollar una metodología para el análisis de núcleos de sedimentos marinos en la llanura abisal y el talud continental del Golfo de México. El objetivo principal del trabajo es validar un método, accesible, reproducible y cuya eficiencia pueda ser medida en términos del porcentaje de recuperación de microplásticos en sedimentos marinos.

1.2 Justificación

En la actualidad existen varias metodologías recientes propuestas para la extracción de microplásticos, sin embargo, no existe un consenso sobre cuáles son las que efectivamente extraen la mayor proporción de microplásticos y hay muy pocos estudios de inter-calibración entre laboratorios. Por lo anterior, se trata de un área de estudio de gran importancia para desarrollar una metodología que se adapte a las necesidades de cada laboratorio y de las muestras que se desean analizar, principalmente para estudiar los sedimentos del océano profundo.

1.3 Objetivos

1.3.1 Objetivo general

Desarrollar una metodología para la recuperación de microplásticos específica para sedimentos del talud continental y de la llanura abisal del Golfo de México.

1.3.2 Objetivos específicos

Realizar experimentos que permitan determinar la metodología óptima para obtener el mayor porcentaje de recuperación de microplásticos posible y que sea consistente.

Comparar el uso de diferentes sales para realizar extracciones de plástico por densidad.

Con base en los resultados de los experimentos, proponer una metodología específica para la extracción de microplásticos los sedimentos profundos del golfo de México, indicando su porcentaje de recuperación y reproducibilidad.

Capítulo 2. Metodología

La metodología de este trabajo se divide en dos etapas principales, la preparación de muestras de sedimento y el diseño experimental para la extracción de microplásticos de sedimentos.

2.1 Preparación de muestras de sedimento con microplásticos añadidos

Las muestras utilizadas en este trabajo fueron de sedimento de núcleos del golfo de México, para asegurar que fueran similares a las muestras objetivo de este protocolo. Estas se tomaron de los centímetros en los cuales se consideró que no debería haber plásticos debido a su profundidad y tasas de sedimentación para evitar interferencia en el procedimiento. A estas muestras de sedimento se les añadió una cantidad conocida de microplásticos (Figura 2) con el fin de poder determinar el porcentaje de recuperación con base a la cantidad inicial de microplásticos en la muestra y la cantidad final tras su procesamiento.

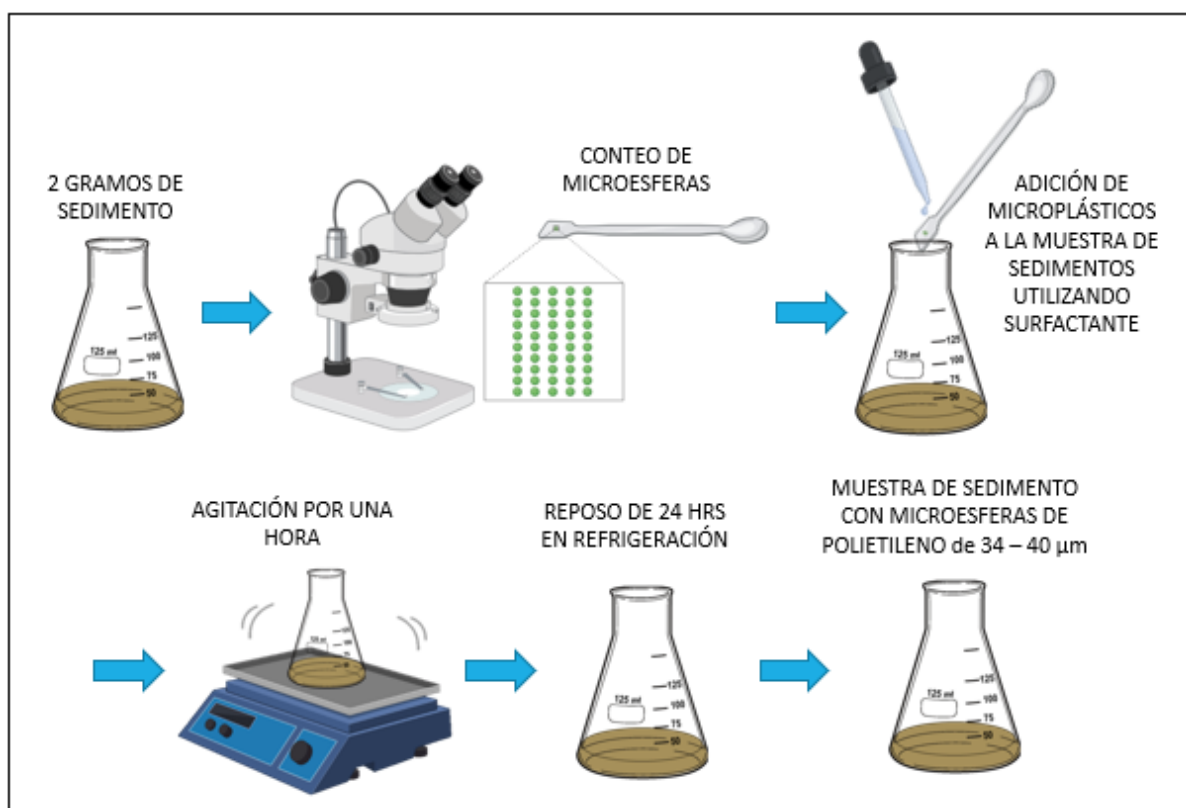


Figura 2 Representación gráfica por pasos del procedimiento de preparación de sedimentos con una cantidad de microplásticos conocida para determinar el porcentaje final de recuperación tras someterlas a la metodología propuesta (Imagen elaborada utilizando el software de imagen e ilustración científica BioRender)

Se prepararon 44 muestras tomando alícuotas de 2 g de sedimento por cada muestra, las cuales fueron colocadas en vasos de precipitado de 50 ml previamente lavados, tapados con aluminio y secados en mufla a 400 °C para eliminar cualquier posible contaminante. A dichas muestras se les añadieron microesferas de polietileno verde fluorescente de tamaño de 34 µm a 40 µm Cospheric® y fragmentos de Polietileno de Alta Densidad o HDPE por sus siglas en inglés, de un tamaño entre 250 µm y 335 µm, obtenidos del raspado de un contenedor de HDPE intemperizado, cuyos fragmentos fueron tamizados para determinar el rango de tamaño. De las 44 muestras, se prepararon 32 con únicamente 50 microesferas y 12 con una mezcla de 30 microesferas y 10 fragmentos de HDPE.

Todas las muestras fueron homogeneizadas para asegurar una integración adecuada de los microplásticos con el sedimento. Se les agregó surfactante, en este caso hexametáfosfato de sodio se colocaron por 5 minutos en baño de ultrasonido, fueron agitados por una hora y se dejaron 24 horas en reposo en refrigeración.

2.2 Extracción de microplásticos

2.2.1 Metodología de propuesta por REMARCO

Las primeras muestras con las que se trabajó fueron proporcionadas por el Laboratorio de Estudios del Medio Ambiente Marino (MEL por sus siglas en inglés) de la Agencia Internacional de Energía Atómica (IAEA por sus siglas en inglés) en Mónaco. Cada una de estas muestras contenían arenas y limos con 50 microesferas de polietileno fluorescente de tamaño de 32 µm a 38 µm Cospheric®. Se realizó el procedimiento inicial para determinar el porcentaje de recuperación, siguiendo el protocolo de Determinación de Abundancia de Microplásticos en Núcleos Sedimentarios establecido por la Red de Investigación Marino-Costera (REMARCO) (Figura 3).

El protocolo establecía que todo el material a utilizar debía ser lavado y secado previo a su uso. El material de vidrio, como los vasos de precipitado que contenían las muestras, fue calentado a 400 °C por 4 horas en una mufla para eliminar cualquier posible contaminación. Así mismo desde la toma de la muestra hasta que finalizó su manejo, se trabajó en un lugar cerrado, en una campana de flujo laminar para evitar la contaminación por microplásticos del ambiente por gravedad y se trabajó utilizando solamente ropa de algodón. Dicho protocolo consta de 4 etapas principales:

- a) Digestión de muestras de sedimento
- b) Separación de microplásticos por flotación
- c) Extracción de microplásticos
- d) Tinción de partículas de microplásticos con rojo de Nilo

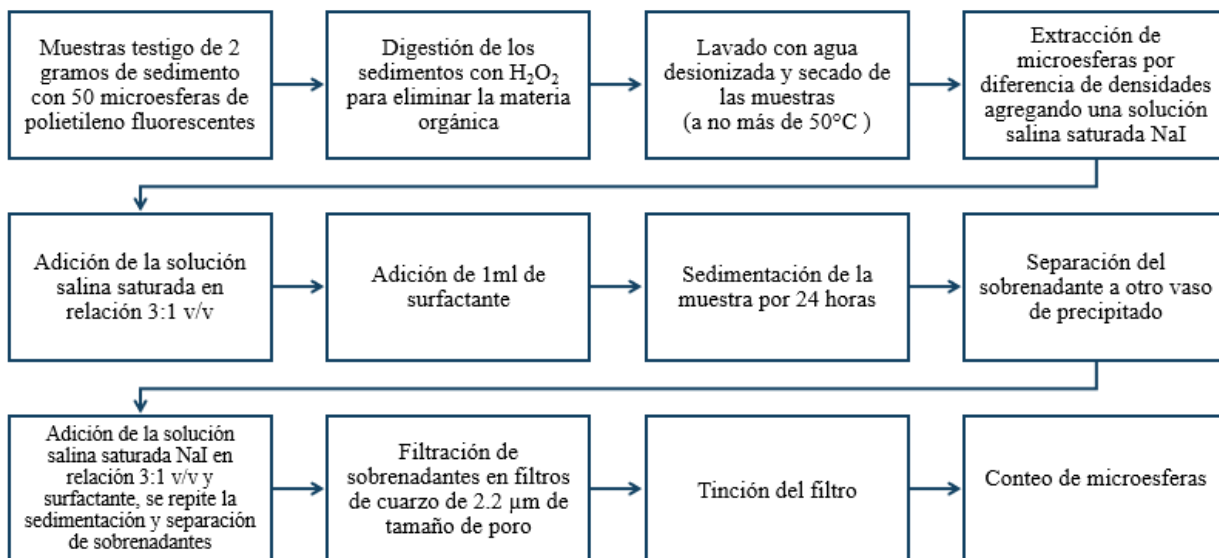


Figura 3 Diagrama de flujo del procedimiento detallado en el Protocolo la Determinación de Abundancia de Microplásticos en Núcleos Sedimentarios propuesto por la Red de Investigación Marino-Costera (REMARCO).

La primera etapa consiste en eliminar la materia orgánica presente en la muestra. A las muestras de sedimento se les agregó H_2O_2 al 20% en intervalos hasta que ya no se observaron más burbujas indicando que se eliminó toda la materia orgánica presente en la muestra. Después las paredes del vaso se lavaron con agua desionizada para evitar que el sedimento se adhiriera a ellas. Posteriormente, la muestra se secó para evaporar los restos de H_2O_2 al 20%. Cuando la muestra sedimentó en el vaso y el sobrenadante se evaporó casi en su totalidad, se añadieron 5 ml de agua desionizada para asegurar que los residuos de H_2O_2 se evaporaran por completo.

Para la segunda etapa se agregó la solución de NaI saturada con una densidad de 1.6 g ml^{-1} en una proporción de 3:1 v/v (3 ml de solución salina saturada por cada ml de sedimento húmedo). Adicionalmente, se agregó 1 ml de surfactante (hexametáfosfato de sodio) y se llevó a agitación por 1 hora. Después la muestra se dejó reposar por 24 horas para que las partículas de mayor tamaño

sedimentaran por gravedad. Después se trasvasó el sobrenadante utilizando una pipeta graduada de vidrio a un nuevo vaso de precipitado limpio denominado “Vaso de Sobrenadantes”. Este procedimiento se repitió con los residuos restantes, agregando la solución de NaI y dejando la muestra reposar por 24 horas. Después de este tiempo se extrajo el sobrenadante y se agregó al “vaso de sobrenadantes” de igual forma que el anterior.

Para la tercera etapa se pasaron los sobrenadantes por un filtro QM-A de 2.2 µm de tamaño de poro mediante un sistema de filtración al vacío. Finalmente, en este caso se omitió la cuarta y última etapa de tinción ya que se trataba de una muestra que contenía microesferas fluorescentes que pueden identificarse bajo luz ultravioleta.

Dentro de estas 4 etapas cabe recalcar que proponen únicamente 2 extracciones utilizando tungstato sódico dihidratado ($\text{Na}_2\text{O}_4\text{W}\cdot 2\text{H}_2\text{O}$) o como alternativa el NaI y se utilizó sedimentación por gravedad para separar por los microplásticos por flotación del sedimento que se acumuló en el fondo del vaso.

En estas pruebas iniciales utilizando las muestras provistas por el MEL de la IAEA con la cantidad de microesferas conocidas el porcentaje de recuperación no supero el 5%, por lo que se procedió a realizar el mismo procedimiento con las muestras de referencia preparadas en el laboratorio para determinar las condiciones óptimas modificando principalmente el número de extracciones realizadas, las sales saturadas utilizadas para la preparación de la solución salina saturada, el surfactante utilizado e introduciendo cambios como el uso de la centrifuga y el lavado exhaustivo del material utilizado. Así mismo se hicieron diferentes ensayos previos como el uso de solventes.

2.2.2 Diseño experimental y metodología propuesta

Las modificaciones realizadas a la metodología propuesta por REMARCO se pueden dividir en los siguientes puntos específicos:

- a. Sales utilizadas en la solución salina saturada, comparando NaCl, NaI y el intercalado entre NaCl y NaI
- b. Los surfactantes utilizados Tritón™ X-100 (TX-100) y hexametáfosfato de sodio (Calgón®)
- c. El número de extracciones

- d. Integración del uso de una centrifuga para separar el sedimento de los microplásticos contenidos en el sobrenadante
- e. Lavado adicional del material de cristal para evitar la pérdida de microplásticos en las paredes de este.

El procedimiento completo se muestra en la Figura 4 a modo de diagrama de flujo en el cual las casillas señaladas marcan los puntos claves en los que se realizaron las modificaciones para comparar resultados y obtener la metodología óptima para la recuperación de microplásticos en sedimentos del océano profundo. Cada ensayo se realizó por cuadruplicado a excepción de los ensayos 3 y 7 que fueron realizados por duplicado debido a cuestiones de manejo de recursos del laboratorio.

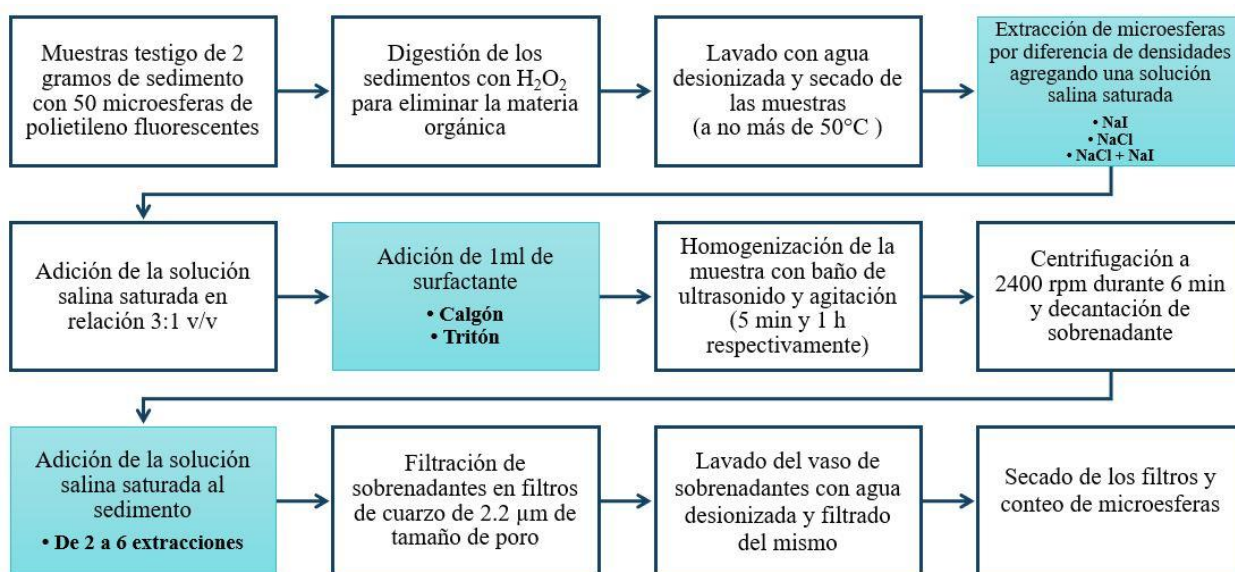


Figura 4 Diagrama de flujo del diseño experimental para la metodología propuesta, en la cual se resaltan los pasos en los cuales se introdujeron las variaciones.

Al igual que lo propone REMARCO, todo el material que fue utilizado fue lavado y secado previo a su uso. El material de vidrio, como los vasos de precipitado que contenían las muestras, fue calentado a 400 °C por 4 horas en una mufla para eliminar cualquier posible contaminación. Así mismo desde la toma de la muestra hasta que finalizó su manejo, se trabajó en una campana de extracción con el fin de tener un área de trabajo cerrada y evitar la contaminación a pesar de trabajar únicamente con partículas fluorescentes de tamaño y forma conocidos, sin embargo, para futuros trabajos con muestras de campo se recomienda el uso de una campana de flujo laminar.

Siguiendo el protocolo de REMARCO sin modificaciones se realizó la digestión de las muestras de

sedimento para eliminar la materia orgánica. A las muestras de sedimento se les agregó H_2O_2 al 20% en intervalos hasta que ya no se observaron más burbujas indicando que se eliminó toda la materia orgánica presente en la muestra. Posterior a la adición de H_2O_2 , las paredes del vaso se lavaron con agua desionizada para evitar que el sedimento se adhiriera a ellas. Posteriormente, la muestra se secó para evaporar los restos de H_2O_2 al 20%. Cuando la muestra sedimentó en el vaso y el sobrenadante se evaporó casi en su totalidad, se añadieron 5 ml de agua desionizada para asegurar que los residuos de H_2O_2 se evaporaran por completo.

Una vez que la muestra estuvo húmeda, sin ningún sobrenadante y a temperatura ambiente, se agregó la solución salina saturada en una proporción de 3:1 v/v (3 ml de solución salina saturada por cada ml de sedimento húmedo). Adicionalmente se agregó 1 ml de Tritón X-100 y se llevó por 5 minutos al baño de ultrasonido para asegurar que la solución salina y el surfactante penetraran en la muestra de sedimento. Pasados los 5 minutos, la muestra se llevó a agitación por 1 hora. En este punto se hicieron diferentes ensayos con NaCl, NaI y alternando ambas sales.

Pasada la hora de agitación, la muestra se trasvasó a un tubo de ensayo con tapa y se centrifugó por 6 minutos a 2100 rpm. Se trasvasó por decantación el sobrenadante a un nuevo vaso de precipitado limpio denominado “vaso de sobrenadantes”; el sedimento restante en el tubo de ensayo se devolvió al vaso inicial añadiendo nuevamente la solución salina saturada. Nuevamente se hicieron ensayos para evaluar el efecto de hacer más de 2 extracciones a la misma muestra, utilizando en cada ensayo el mismo volumen utilizado anteriormente y respetando la relación 3:1 v/v.

Con cada adición de solución salina para realizar la extracción se añadió 1 ml de surfactante haciendo una comparativa entre el hexametáfosfato de sodio y el Tritón X-100. Se repitió cuantas veces fuera establecido por cada ensayo el proceso desde los 5 minutos de baño de ultrasonido hasta la decantación del sobrenadante resultante de la extracción. Al hacer la última extracción, se hizo una limpieza de las paredes del primer vaso de precipitado con la misma solución para asegurar que no quedaran restos de muestra ni de posibles microplásticos en las paredes del vaso de precipitado. El sedimento quedó finalmente en el tubo de ensayo.

Para llevar a cabo la filtración de los sobrenadantes, se montó un sistema de filtración al vacío, para lo cual se colocó el embudo Büchner sobre el matraz Kitasato. Se aseguró el vacío cubriendo la unión del embudo y el matraz con Parafilm® para evitar pérdidas de presión por fugas. La filtración se llevó a cabo por goteo (Figura 5), utilizando un soporte universal para sostener la pipeta que contenía el sobrenadante y, con

ayuda de una propipeta, se aseguró la caída del sobrenadante de manera lenta y en el centro del filtro. Los sobrenadantes se tomaron con la pipeta del “vaso de sobrenadantes” y se filtraron. En cada ensayo se utilizaron más de un solo filtro, con el fin de evitar la saturación del mismo.

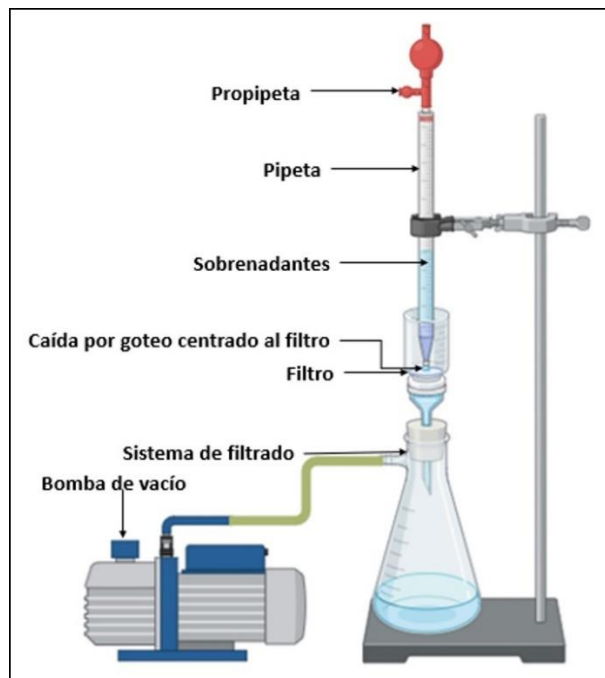


Figura 5 Sistema de filtrado propuesto en este trabajo para la etapa de filtración del protocolo de extracción de microplásticos en sedimentos marinos por diferencia de densidades (Imagen elaborada utilizando el software de imagen e ilustración científica BioRender)

Una vez finalizadas las extracciones, al primer vaso de precipitado que debía quedar completamente vacío se le hizo un último lavado con agua desionizada para asegurar que ningún microplástico permaneciera en las paredes. También se hizo un último lavado al “vaso de sobrenadantes”, ya que todos los sobrenadantes fueron filtrados. Ambos lavados con agua desionizada se hicieron dejando caer el agua por las paredes para arrastrar posibles microplásticos. Se tomó la precaución de inclinar el vaso para concentrar el lavado resultante en la menor superficie posible del vaso, el cual fue finalmente tomado con la misma pipeta graduada con la que se trabajó. Finalmente, a la misma pipeta graduada se le hizo un lavado final con agua desionizada dejando caer gotas de agua desionizada por la parte superior para asegurar el arrastre de todos los posibles microplásticos que pudieran haber permanecido pegados a las paredes durante el filtrado.

Los filtros fueron secados en una placa de calentamiento para facilitar el conteo de microplásticos recuperados. Se hicieron los conteos de manera visual en un estereomicroscopio y fueron registrados para

obtener la cantidad de microesferas recuperadas como porcentaje de recuperación y a partir de dichos resultados determinar las condiciones óptimas para la extracción de microplásticos de sedimentos marinos profundos. Todo el procedimiento se representa de forma gráfica paso a paso para una mejor comprensión en la Figura 6.

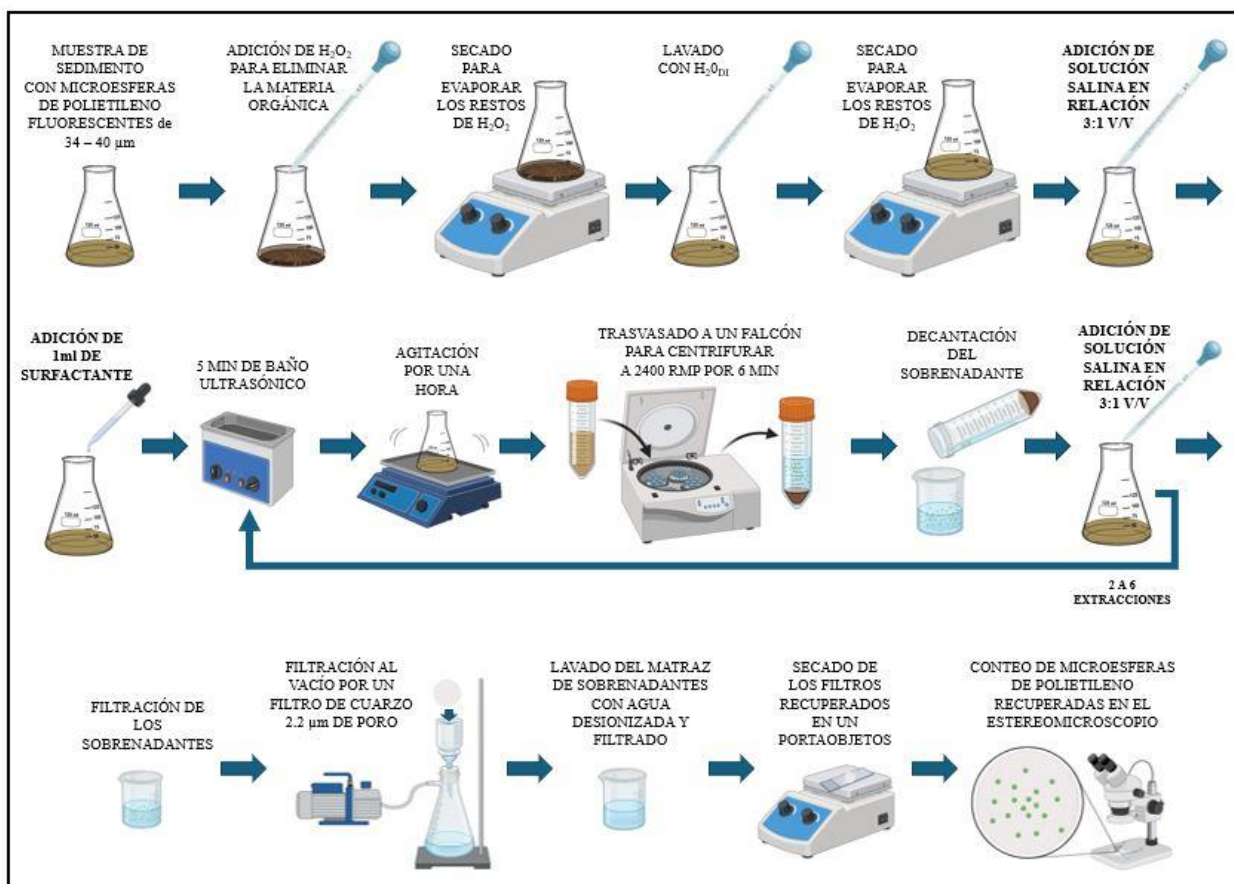


Figura 6 Representación gráfica de la metodología llevada a cabo en este trabajo, en donde se detallan todos los pasos de forma visual, marcando con negritas el texto de los pasos en los cuales se realizaron las comparativas de condiciones, la sal utilizada en la solución saturada, el surfactante a utilizar y la cantidad de extracciones (Imagen elaborada utilizando el software de imagen e ilustración científica BioRender)

Capítulo 3. Resultados

Como resultados de este trabajo se obtuvieron diferentes porcentajes de recuperación promedio de microplásticos en múltiples condiciones. La comparación y el análisis de dichos porcentajes de recuperación permitieron construir un protocolo con las condiciones más eficientes para asegurar el mayor porcentaje de recuperación posible de microplásticos en muestras de sedimentos marinos profundos.

3.1 Resultados generales

En la Tabla 2 se resumen los porcentajes de recuperación promedio obtenidos de cada ensayo. En la primera columna se indica la metodología usada, únicamente el primer renglón corresponde a las muestras enviadas por el MEL de la IAEA, trabajadas siguiendo al pie de la letra la metodología propuesta por REMARCO.

Posteriormente, en la segunda columna se indica la muestra utilizada en el ensayo, únicamente los renglones 1, 2 y 13 corresponden a las muestras enviadas por el MEL de la IAEA, los dos primeros correspondientes a la metodología propuesta por REMARCO y un ensayo con solventes, mientras que en el caso del renglón 13 corresponde a la comprobación de la metodología final propuesta, utilizando una muestra testigo de otro laboratorio que no fuera el propio. El resto de las muestras fueron preparadas en el laboratorio como se describe en la metodología.

En las columnas Extracciones, Sal en solución saturada y Surfactante se detallan las condiciones a comparar como se mostró en el diagrama de la Figura 4. La columna “Sedimentación” corresponde al uso de la centrifuga, la comparativa se observa en las filas 3, 4 y 5, a partir de este ensayo el resto de las pruebas se realizaron haciendo uso de la centrífuga.

Finalmente, los resultados de cada ensayo se muestran en las columnas de “Porcentaje de recuperación” obtenido del total de microesferas o fragmentos recuperados sobre la cantidad inicial colocada en la muestra analizada. En los casos con un valor en la columna de “Desviación estándar” el valor de porcentaje de recuperación es un promedio de diferentes ensayos bajo las mismas condiciones, con su respectiva desviación estándar.

Tabla 2 Porcentajes de recuperación promedio obtenido de los ensayos progresivos agrupados por las condiciones a las que se llevaron a cabo para la extracción microplásticos, los cuales consistían en una cantidad conocida de microesferas de polietileno fluorescentes únicamente.

Ensayo	Método	Muestra	Extracciones	Reactivo	Sedimentación	Surfactante	Porcentaje de recuperación	Desviación estándar
1	REMARCO	IAEA	2	NaI	24 h por gravedad	Calgón	10%	3%
2	Solventes	IAEA	3	Solventes: Diclorometano, Etanol, Metanol	30 min por gravedad	Calgón	33%	NA
3	Separación por Densidad	Sedimento c/microesferas	3	NaI	12 h por gravedad	Calgón	0%	NA
4	Separación por Densidad	Sedimento c/microesferas	3	NaI	24 h por gravedad	Calgón	2%	NA
5	Separación por Densidad	Sedimento c/microesferas	3	NaI	Centrifugación	Calgón	37%	7%
6	Separación por Densidad	Sedimento c/microesferas	3	NaCl	Centrifugación	Calgón	6%	5%
7	Separación por Densidad	Sedimento c/microesferas	3	NaCl	Centrifugación	TX-100	27%	10%
8	Separación por Densidad	Sedimento c/microesferas	4	NaI	Centrifugación	TX-100	77%	7%
9	Separación por Densidad	Sedimento c/microesferas	5	NaI	Centrifugación	TX-100	84%	10%
10	Separación por Densidad	Sedimento c/microesferas	4	2 NaCl 2 NaI	Centrifugación	TX-100	63%	17%
11	Separación por Densidad	Sedimento c/microesferas	5	2 NaCl 3 NaI	Centrifugación	TX-100	71%	17%
12	Separación por Densidad	Sedimento c/microesferas	5	1 NaCl 4 NaI	Centrifugación	TX-100	89%	6%
13	Separación por Densidad	IAEA	6	2 NaCl 4 NaI	Centrifugación	TX-100	96%	NA

En la Tabla 3 se resumen los resultados correspondientes a los ensayos realizados con las muestras que contenían microesferas de polietileno fluorescente y fragmentos de HDPE. Se consideraron las 40 partículas como un conjunto de microplásticos para comparar los porcentajes finales de recuperación en cada ensayo. En este caso solamente se evaluaron 3 condiciones, comparando las dos sales y su uso conjunto, haciendo un ensayo utilizando únicamente NaCl, un segundo ensayo utilizando únicamente NaI y un tercer y último ensayo haciendo la mitad de las extracciones con NaCl y la otra mitad con NaI. El mayor porcentaje de recuperación promedio de $86\% \pm 7\%$ se alcanzó con el uso de ambas sales.

Tabla 3 Porcentajes de recuperación obtenidos de los ensayos progresivos agrupados por las condiciones a las que se llevaron a cabo para la extracción de microplásticos, los cuales consistían en una cantidad conocida de microesferas de polietileno fluorescentes y fragmentos de HDPE.

Método	Muestra	Extracciones	Reactivo	Sedimentación	Surfactante	Porcentaje de recuperación	Desviación estándar
1 Separación por Densidad	Sedimento c/microplásticos 34 μm - 335 μm	3	NaCl	Centrifugación	Calgón	20%	5%
2 Separación por Densidad	Sedimento c/microplásticos 34 μm - 335 μm	4	NaI	Centrifugación	TX-100	81%	14%
3 Separación por Densidad	Sedimento c/microplásticos 34 μm - 335 μm	4	2 NaCl 2 NaI	Centrifugación	TX-100	86%	7%

Debido a que en cada ensayo se utilizaron más de un filtro para evitar la saturación de los mismos, se contó con diferentes filtros para las extracciones con NaCl que, de las extracciones con NaI, así como un filtro diferente para el enjuague con agua desionizada. A partir de la observación de los filtros se evaluó el impacto del sistema de filtración y la adición de lavados con agua desionizada. Se presentan ejemplos de filtros en cada etapa del procesamiento de las muestras de un mismo ensayo (Figura 7). Se detallan los porcentajes de microplásticos recuperados en cada etapa, la distribución de estos en los filtros y el aspecto físico de cada filtro en las distintas fases del proceso. Se tomaron como ejemplo una muestra del ensayo 8 con microesferas de polietileno fluorescente, una muestra del ensayo 10 con microesferas de polietileno fluorescente y la muestra única proporcionada por el IAEA que fue procesada con la metodología final propuesta en este trabajo que corresponde al ensayo 13.

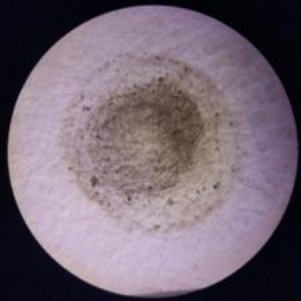
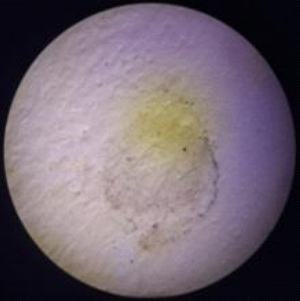
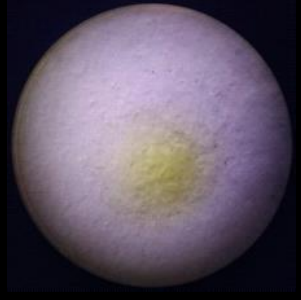
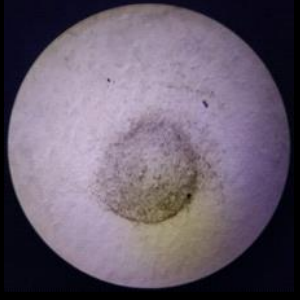
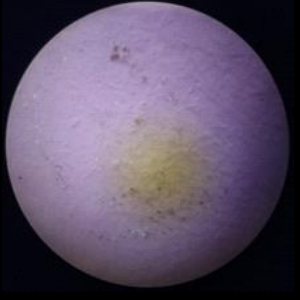
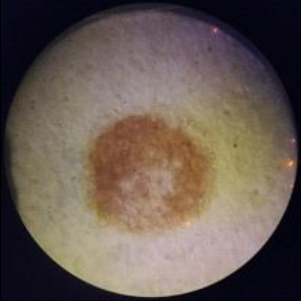
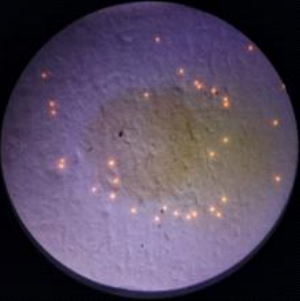

Ensayo	Filtro 1	Filtro 2	Filtro 3	Conteo final
8	 Muestra 8 (lavados con NaI) – 4 Microesferas, 11% de la recuperación total	 Muestra 8 (enjuague con H2O DI) – 32 Microesferas, 89% de la recuperación total	N/A	36 de 50
10	 Muestra 29 (lavados con NaCl) – 16 Microesferas, 39% de la recuperación total	 Muestra 29 (lavados con NaI) – 0 Microesferas, 0% de la recuperación total	 Muestra 29 (enjuague con H2O DI) – 25 Microesferas, 51% de la recuperación total	41 de 50
13	 IAEA 4 (lavados de NaCl y NaI) – 8 Microesferas, 17% de la recuperación total	 IAEA 4 (enjuague con H2O DI Vaso) – 33 Microesferas, 69% de la recuperación total	 IAEA 4 (enjuague con H2O DI Pipeta) – 7 Microesferas, 15% de la recuperación total	48 de 50

Figura 7 Evidencia fotográfica de las microesferas de polietileno fluorescente recuperadas en cada filtración de tres muestras correspondientes a tres ensayos distintos a modo de ejemplo, con el conteo de microesferas recuperadas por etapa de filtración de un mismo ensayo, con sus respectivos conteos finales (Fotografías propias tomadas en un estereomicroscopio Leica con una ampliación de X100)

3.2 Análisis estadístico

Una vez obtenidos valores representativos de cada ensayo se llevó a cabo una comparación estadística de ocho de los trece ensayos realizados con 50 microesferas de polietileno fluorescente (Tabla 4), en esta

prueba estadística se excluyen los ensayos 2, 3, 4 y 13 debido a que son muestras únicas. Se hizo la comparativa entre los ensayos desde el procedimiento inicial propuesto por REMARCO hasta el procedimiento propuesto final con las modificaciones secuenciales que se hicieron a lo largo de la experimentación.

Tabla 3 Condiciones relevantes de nueve de los trece ensayos realizados para extraer microesferas de polietileno fluorescentes, en el software estadístico Origin, evaluados por medio de ANOVA y prueba Post Hoc de Tukey

Ensayo	Extracciones	Solución saturada	Separación	Surfactante
1	2	Nal	24 h gravedad	Calgón
5	3	Nal	Centrífuga	Calgón
6	3	NaCl	Centrífuga	Calgón
7	3	NaCl	Centrífuga	Tritón
8	4	Nal	Centrífuga	Tritón
9	5	Nal	Centrífuga	Tritón
10	2	NaCl	Centrífuga	Tritón
	2	Nal		
11	2	NaCl	Centrífuga	Tritón
	3	Nal		
12	1	NaCl	Centrífuga	Tritón
	4	Nal		

Tabla 4 Resultados del ANOVA en el cual se comparan las medias de ocho de los trece ensayos realizados para extraer microesferas de polietileno fluorescentes de sedimentos marinos, obtenidos con ORIGIN 2018 LABVIEW.

	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Value	Prob>F
Model	8	31092	3886.5	35.52842	<0.0001
Error	23	2516	109.3913		
Total	31	33608			

Se compararon los ensayos utilizando un ANOVA de una vía (Tabla 5) y el método Post hoc de Tukey (Tabla 6) con un nivel de significancia α (alfa) de 0.05. En este caso se optó por hacer la prueba Post Hoc de Tukey debido a su aplicabilidad para analizar las diferencias entre diversos tratamientos, en este caso para

analizar cada cambio introducido en la metodología y determinar el impacto que estos tuvieron con respecto a los demás. Las diferencias significativas consideradas fueron aquellas con un valor de P obtenido en el análisis estadístico menor a 0.00001.

Tabla 5 Resultados de la prueba post hoc de Tukey de nueve de los trece ensayos realizados para extraer microesferas de polietileno fluorescentes de sedimentos marinos, en donde los valores de Sig. iguales a 1 indican los ensayos que son significativamente diferentes, obtenidos con ORIGIN 2018 LABVIEW.

Means Comparisons

Tukey Test

	MeanDiff	SEM	q Value	Prob	Alpha	Sig	LCL	UCL
E5 E1	27	9.05779	4.21557	0.12037	0.05	0	-3.90966	57.90966
E6 E1	-4	7.39565	0.76489	0.99973	0.05	0	-29.23763	21.23763
E6 E5	-31	9.05779	4.8401	0.04895	0.05	1	-61.90966	-0.09034
E7 E1	17	9.05779	2.65425	0.63472	0.05	0	-13.90966	47.90966
E7 E5	-10	10.45903	1.35215	0.98642	0.05	0	-45.6914	25.6914
E7 E6	21	9.05779	3.27878	0.37158	0.05	0	-9.90966	51.90966
E8 E1	67	7.39565	12.8119	<0.0001	0.05	1	41.76237	92.23763
E8 E5	40	9.05779	6.24529	0.00515	0.05	1	9.09034	70.90966
E8 E6	71	7.39565	13.57679	<0.0001	0.05	1	45.76237	96.23763
E8 E7	50	9.05779	7.80662	3.735E-4	0.05	1	19.09034	80.90966
E9 E1	74	7.39565	14.15045	<0.0001	0.05	1	48.76237	99.23763
E9 E5	47	9.05779	7.33822	8.21346E-4	0.05	1	16.09034	77.90966
E9 E6	78	7.39565	14.91534	<0.0001	0.05	1	52.76237	103.23763
E9 E7	57	9.05779	8.89955	<0.0001	0.05	1	26.09034	87.90966
E9 E8	7	7.39565	1.33856	0.98725	0.05	0	-18.23763	32.23763
E10 E1	53	7.39565	10.13478	<0.0001	0.05	1	27.76237	78.23763
E10 E5	26	9.05779	4.05944	0.14838	0.05	0	-4.90966	56.90966
E10 E6	57	7.39565	10.89967	<0.0001	0.05	1	31.76237	82.23763
E10 E7	36	9.05779	5.62077	0.01438	0.05	1	5.09034	66.90966
E10 E8	-14	7.39565	2.67711	0.62471	0.05	0	-39.23763	11.23763
E10 E9	-21	7.39565	4.01567	0.15714	0.05	0	-46.23763	4.23763
E11 E1	61	7.39565	11.66456	<0.0001	0.05	1	35.76237	86.23763
E11 E5	34	9.05779	5.3085	0.02371	0.05	1	3.09034	64.90966
E11 E6	65	7.39565	12.42945	<0.0001	0.05	1	39.76237	90.23763
E11 E7	44	9.05779	6.86982	0.00181	0.05	1	13.09034	74.90966
E11 E8	-6	7.39565	1.14733	0.99532	0.05	0	-31.23763	19.23763
E11 E9	-13	7.39565	2.48589	0.70702	0.05	0	-38.23763	12.23763
E11 E10	8	7.39565	1.52978	0.97131	0.05	0	-17.23763	33.23763
E12 E1	79	7.39565	15.10656	<0.0001	0.05	1	53.76237	104.23763
E12 E5	52	9.05779	8.11888	2.21459E-4	0.05	1	21.09034	82.90966
E12 E6	83	7.39565	15.87145	<0.0001	0.05	1	57.76237	108.23763
E12 E7	62	9.05779	9.68021	<0.0001	0.05	1	31.09034	92.90966
E12 E8	12	7.39565	2.29467	0.78345	0.05	0	-13.23763	37.23763
E12 E9	5	7.39565	0.95611	0.99867	0.05	0	-20.23763	30.23763
E12 E8	12	7.39565	2.29467	0.78345	0.05	0	-13.23763	37.23763
E12 E9	5	7.39565	0.95611	0.99867	0.05	0	-20.23763	30.23763
E12 E10	26	7.39565	4.97178	0.04007	0.05	1	0.76237	51.23763
E12 E11	18	7.39565	3.442	0.31295	0.05	0	-7.23763	43.23763

Finalmente, a partir de los resultados obtenidos del ANOVA se elaboró una gráfica de barras de error de los porcentajes de recuperación de cada ensayo (Figura 8), en donde se marcan con un (*) los ensayos significativamente diferentes al protocolo final propuesto (Ensayo 12).

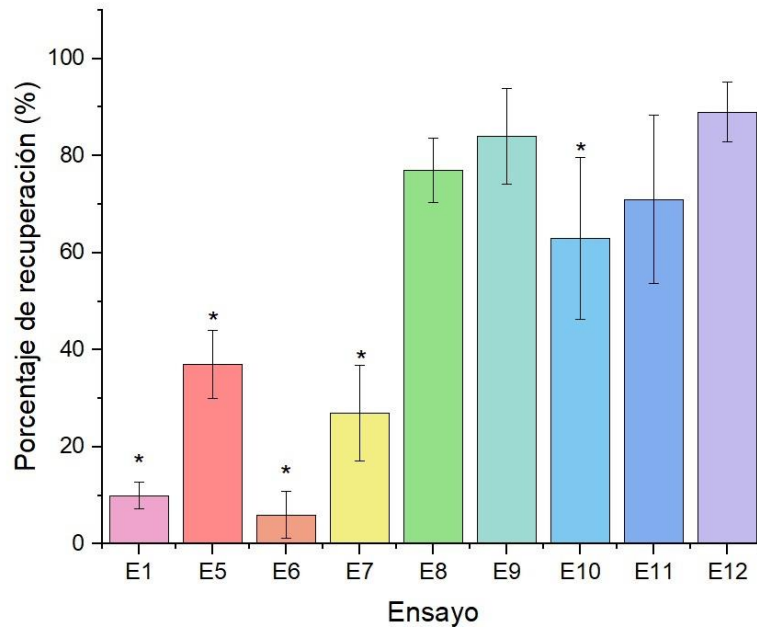


Figura 8 Gráfica de barras de los porcentajes de recuperación de cada ensayo, elaborada con ORIGIN 2018 LABVIEW.

Capítulo 4. Discusión

Los resultados obtenidos tratando la muestra provista por el MEL de la IAEA utilizando la metodología propuesta por REMARCO, demostraron una recuperación baja con un promedio de 10%. Sin embargo, los resultados se mantienen constantes con una desviación estándar de 3%. Estos resultados pueden indicar que la metodología no es la adecuada por la naturaleza de los sedimentos usados en esta investigación (llanura abisal y la plataforma continental del Golfo de México). Esta metodología tiene una duración aproximada de 5 días de procesamiento ya que la separación de microplásticos se hace por flotación, al ser contenida en la solución salina de alta densidad, separándolos del sedimento que se deposita en el fondo por gravedad. Por esta razón y debido a que en la literatura hay pocas referencias a microplásticos extraídos de núcleos de sedimentos de agua profundas, se decidió hacer modificaciones tomando como punto de partida la metodología de REMARCO.

Los cambios introducidos a la metodología de REMARCO denominada como **Ensayo 1**, se enlistan en la Tabla 2 en donde se resumen las modificaciones, sus condiciones y los porcentajes de recuperación promedio hasta llegar al **Ensayo 12**, cada modificación fue estudiada para tomar las decisiones que nos llevaran a la metodología propuesta definitiva (ver Anexo) y finalmente comparada utilizando una muestra de las provistas por el MEL de la IAEA cuyo resultado corresponde al **Ensayo 13**.

El **Ensayo 2** se realizó utilizando solventes para evaluar alternativas, como se propone en la literatura (Stile et al., 2021). Se hicieron tres lavados utilizando tres solventes diferentes, y así evaluar su capacidad de extracción. Primero se añadió diclorometano, se agitó manualmente y se decantó el solvente para ser filtrado. Posteriormente se repitió la acción utilizando etanol y finalmente metanol, cuidando de cambiar el filtro para cada solvente. Con este ensayo se obtuvo un porcentaje de recuperación del 33%, aumentando la recuperación en un 23%. Además, el tiempo de procesamiento se redujo considerablemente ya que al ser muy volátiles los solventes, la filtración debía hacerse rápidamente tras añadir el solvente a la muestra. A pesar de que se observó un aumento en el porcentaje de recuperación, este continuó siendo muy bajo, por lo cual no resultó viable al tratarse de solventes potencialmente dañinos para el medio ambiente y de difícil disposición

A partir de este momento se trabajó únicamente con las muestras con una cantidad conocida e identificable de microplásticos elaboradas según la metodología (Figura 2). Uno de los principales retos de esta metodología fue disminuir el tiempo de procesamiento de las muestras, ya que el objetivo era analizar

diferentes núcleos de sedimento, de los cuales es conveniente tomar submuestras, lo cual representaba un alto volumen de trabajo. En la literatura se han propuesto distintos métodos de agitación, debido a la importancia de separar el sedimento de los microplásticos, ya que podrían estar encapsulándolos (He et al., 2021). En Constant et al., (2021) evaluaron la diferencia entre una agitación manual utilizando una varilla de vidrio o metal, con aire mediante un sistema de aireación y mediante de la muestra agitada manualmente y centrifugada, de este trabajo se determinó que la centrifuga ha sido utilizada en trabajos de extracción de microplásticos, además de que se menciona la importancia de realizar múltiples extracciones. Con esta evidencia de la literatura se procedió a evaluar el uso de la centrifugación para este procedimiento y se confirmó la importancia de agitar la muestra en este caso particular con un agitador orbital para evitar que la muestra se viera alterada al permanecer en el mismo vaso durante la agitación.

Con los **Ensayos 3, 4 y 5** se realizó una comparación preliminar utilizando NaI como solución saturada para la separación por filtración, entre 12 horas de sedimentación, 24 horas de sedimentación y 6 minutos de centrifugación para separar el sobrenadante de los sedimentos. En estos ensayos a las 12 horas se obtuvo un porcentaje de recuperación de 0% y a las 24 horas del 2%. Mientras que haciendo uso de la centrifuga se obtuvo un porcentaje de recuperación promedio del $37\% \pm 7\%$. Una vez que se comprobó que los microplásticos no se depositaban en el fondo junto con los sedimentos al ser centrifugados se tomó la decisión de continuar centrifugando el resto de las muestras, debido a que disminuía considerablemente el tiempo de procesamiento de las muestras, lo cual no solo era una ventaja para analizar un mayor número de muestras, sino que también permitió evitar la oxidación del yoduro en el filtro, facilitando conteo de microesferas recuperadas. Una vez determinado el uso de la centrifuga se procedió a evaluar el tipo de surfactante a utilizar.

Inicialmente se trabajó con hexametáfosfato de sodio comúnmente conocido como Calgón, sin embargo, debido a la importancia de evitar la pérdida de microesferas adheridas a las paredes de los materiales de vidrio utilizados a lo largo del proceso, se consideró el uso del surfactante Tritón™ X-100 el cual es un surfactante no iónico comúnmente utilizado. El uso del surfactante es de gran importancia debido a que estos afectan las propiedades fisicoquímicas de la superficie de los plásticos que son polímeros hidrofóbicos. El Tritón™ X-100 es un tensoactivo no iónico permite reducir la tensión superficial del agua facilitando que los microplásticos se dispersen en el agua que los contiene (Xia et al., 2020) facilitando en este caso particular su transferencia de los sedimentos, a la solución salina saturada y finalmente al filtro sin quedarse adheridos a las paredes del material de vidrio utilizado. Para la comparación de la eficiencia del uso de ambos surfactantes se realizaron los **Ensayos 6 y 7** utilizando NaCl, solamente con tres extracciones y utilizando la centrifuga. En este caso se obtuvieron $6\% \pm 5\%$ y $27\% \pm 10\%$ de recuperación

respectivamente. A pesar de que estos no resultaron ser significativamente diferentes con la prueba de Tukey, se tomó la decisión de utilizar Tritón X-100 debido a su disponibilidad en nuestro caso particular y debido al resultado preliminar que mostró un mayor porcentaje de recuperación.

Con los resultados previos obtenidos se decidió continuar evaluando el número de extracciones a realizar, utilizando la centrifugación como método de sedimentación y el uso de Tritón™ X-100 como surfactante. Además de determinar el número de extracciones a realizar a cada muestra se evaluó la sal más adecuada a utilizar para la solución salina saturada. Se decidió hacer ensayos utilizando NaI y NaCl. Se optó por el uso de NaCl, una sal inocua, de fácil acceso, y de menor costo. Al prepararse la solución saturada alcanza una densidad de 1.2 g/ml, a diferencia de la solución saturada de NaI que alcanza una densidad de 1.6 g/ml. Para evaluar estas condiciones se compararon los **Ensayos 7 y 8** en los cuales se obtuvieron $27\% \pm 10\%$ de recuperación con NaCl mientras que con NaI se obtuvo un $77\% \pm 7\%$ de recuperación, los ensayos son significativamente diferentes de acuerdo con la prueba de Tukey. Esto puede deberse a la diferencia de densidad, lo cual explicaría por qué el NaCl resultó no ser de gran eficiencia en comparación con el NaI. Se ha reportado que el NaI es una excelente alternativa para realizar la separación por densidad (Constant et al., 2021).

Para la evaluación del número de extracciones se compararon los **Ensayos 8 y 9** utilizando NaI obteniendo un porcentaje de recuperación de $77\% \pm 7\%$ con cuatro extracciones aumentando a $84\% \pm 10\%$ con cinco extracciones. Esto se obtuvo sin considerar las modificaciones de solvente y uso de la centrifuga para la sedimentación, y aumentaron considerablemente en comparación al 10% obtenido únicamente con dos extracciones en el **Ensayo 1**. Con estos resultados se procedió a probar aumentar el número de extracciones haciendo uso conjunto del NaCl al principio y al final de estas, con el NaI en las extracciones intermedias. El uso intercalado de ambas soluciones saturadas se probó con el fin de disminuir el uso de NaI, para ser comparadas con un ensayo únicamente con NaI.

En los **Ensayos 10, 11 y 12** se obtuvieron porcentajes de recuperación de $63\% \pm 17\%$ con dos extracciones con NaCl y dos extracciones de NaI sumando cuatro extracciones totales, $71\% \pm 17\%$ con dos extracciones con NaCl y dos extracciones de NaI sumando cinco extracciones totales y finalmente $89\% \pm 6\%$ con una extracción con NaCl y cuatro extracciones de NaI sumando cinco extracciones totales. De estos tres ensayos únicamente el Ensayo 10 y el 12 son significativamente diferentes, lo cual indica que entre cuatro y cinco extracciones alternadas no hay diferencia significativa, así como no la hay entre realizar tres o cuatro extracciones con NaI siempre y cuando sean cinco extracciones totales. Con lo cual se puede concluir que se deben hacer al menos cuatro extracciones con NaI y que hacer dos extracciones extras con

NaCl potencia la extracción de microplásticos. De esta manera es posible disminuir la cantidad de NaI utilizada sin disminuir el número total de extracciones.

Con todas las modificaciones realizadas hasta el Ensayo 12 se determinó que este último tenía las condiciones ideales para obtener un porcentaje de recuperación aceptable y replicable por lo que se procedió a ponerlo a prueba con el **Ensayo 13**. Este consistió en el procesamiento de una de las muestras testigo provistas por el MEL de la IAEA utilizando la metodología final. En este caso al ser la matriz de la muestra de una consistencia ligeramente más arenosa se agregó una última extracción utilizando NaCl para asegurar que no quedarán residuos de la matriz ni de los microplásticos en el primer vaso de precipitado antes de realizar los últimos enjuagues con agua desionizada. Cabe mencionar que, a pesar de ser una muestra única, se observó que el orden de las extracciones también puede influir en el resultado final, ya que en el Ensayo 13 se observó que el porcentaje de recuperación se mantuvo por arriba del 90% haciendo la primera y la última extracción con NaCl, junto con cuatro extracciones intermedias con NaI.

En la figura 9 se aprecia de forma gráfica las comparaciones estadísticas de cada etapa del desarrollo de la metodología a proponer. Se observa un aumento progresivo tras la evaluación del impacto de cada cambio introducido y se resaltan los ensayos que resultaron ser significativamente diferentes del Ensayo 12 que fue considerado el ensayo final con las condiciones ideales. La principal diferencia que se observa es con los ensayos con menos de 3 extracciones independientemente de la sal utilizada en la solución saturada, ya que hay diferencias significativas con los ensayos 1, 5, 6 y 7. El otro ensayo significativamente diferente es el ensayo 10, el cual se hicieron cuatro extracciones pero solamente dos fueron con NaI, mientras que en los ensayos restantes que no muestran diferencias se hicieron tres o más extracciones con NaI y más de cuatro extracciones totales. A pesar de no ser significativamente diferentes los ensayos 8,9,11 y 12, se considera el 12 el ensayo con las condiciones ideales ya que se disminuye el uso de NaI sin afectar el porcentaje de recuperación y debido a que tiene un error menor al resto, con una desviación estándar del 6%, la menor de los cuatro mencionados. Es decir que es un método reproducible.

Los resultados de los ensayos de recuperación de microplásticos, que incluyeron tanto microesferas de polietileno como fragmentos, muestran variaciones considerables en la eficacia de los métodos empleados. El uso de NaCl solo permitió recuperar el $20\% \pm 5\%$ de las partículas, revelando una baja eficiencia en la separación de los microplásticos de la muestra inicial. En contraste, el método basado en NaI demostró una recuperación mucho mayor, del $81\% \pm 14\%$, indicando nuevamente que este reactivo es más efectivo para separar microesferas y fragmentos, probablemente debido a su mayor densidad que

facilita la flotación. La combinación de ambos métodos, que consistió en dos extracciones con NaCl seguidas de dos con NaI, resultó ser la más eficiente en este caso, con una recuperación del $86\% \pm 7\%$.

A pesar de estos resultados prometedores, es crucial considerar que estos ensayos son complementarios y no tan exhaustivos como los realizados únicamente con microesferas. Sin embargo, mantienen un comportamiento similar al tener una recuperación más alta utilizando Yoduro de Sodio únicamente en comparación con extracciones con cloruro y yoduro de sodio en el mismo ensayo.

Para obtener una comprensión más completa de la eficacia de estos dos métodos, futuros estudios podrían beneficiarse de una evaluación más completa que incluya microplásticos de diferentes tamaños y formas. La incorporación de partículas de diversos tamaños permitirá determinar la aplicabilidad y eficiencia del método combinado en contextos más variados y complejos, optimizando aún más la recuperación de microplásticos en diferentes escenarios. Esta investigación adicional podría proporcionar información valiosa sobre la adaptabilidad del método a diferentes condiciones y mejorar las estrategias de muestreo y análisis para un rango más amplio de microplásticos.

Adicional a las comparaciones estadísticas se observaron puntos de gran relevancia para potenciar la recuperación de microplásticos. Como la experiencia del analista, la adición del baño de ultrasonido para facilitar la penetración de la solución saturada, la importancia del sistema de filtrado, el papel de cada solución saturada empleada en el uso alternado de sales y el enjuague final del material utilizado con agua desionizada. De todas estas observaciones se puede señalar la importancia de cada etapa del proceso al inspeccionar los filtros con las microesferas depositadas después de la filtración de los sobrenadantes.

Durante el proceso de extracción de microplásticos, se realizó un cambio de filtro en cada etapa, cambiando en un inicio de filtro al hacer las extracciones de NaCl y para usar uno nuevo en las extracciones con NaI. Esto se hizo con el fin de garantizar la recolección adecuada de las partículas y evitar la saturación del filtro o la pérdida de partículas por su desplazamiento hacia las orillas del mismo. Adicionalmente, se utilizó un filtro diferente en la implementación de un procedimiento de lavado con agua desionizada para los materiales de vidrio, como vasos de precipitados y pipetas. Esto último se hizo con el fin de minimizar la posibilidad de que los microplásticos se adhirieran a las paredes de estos utensilios.

En la muestra ejemplo analizada de una de las cuatro réplicas del ensayo 8 (Figura 7), se observó que en el primer filtro con NaI se recuperaron 4 microesferas de un total de 50, lo que corresponde al 11%, mientras que, en el segundo filtro, después del lavado con agua desionizada, se recuperaron 32

microesferas, equivalentes al 89%. Este resultado destaca cómo el lavado con agua desionizada permitió recuperar una cantidad significativamente mayor de microesferas que se habían quedado adheridas al vaso de precipitado durante la etapa de extracción. En el caso del ejemplo analizada de una de las cuatro réplicas del ensayo 10, el primer filtro con NaCl recuperó 16 microesferas, es decir, el 39% del total, mientras que el segundo filtro con NaI no recuperó ninguna, lo que sugiere que las microesferas se quedaron en el vaso hasta que se realizó el lavado. En el tercer filtro, que correspondió al lavado con agua desionizada, se recuperaron 25 microesferas, equivalentes al 51%. Esto indica que, aunque el NaI extrajo las microesferas, una parte significativa se quedó en el vaso hasta que se efectuó el lavado final.

Por último, se muestran los resultados del ensayo 13, el ensayo de comprobación, en el cual el primer filtro, que combinó los lavados con NaI y NaCl, recuperó 8 microesferas, el 17%, mientras que en el tercer filtro solo con agua desionizada se recuperaron 33 microesferas, equivalentes al 69%. Este último filtro, que correspondió únicamente al lavado de la pipeta, también recuperó 7 microesferas, el 15%. Estos resultados confirman que los dos últimos filtros representaron las recuperaciones adicionales obtenidas únicamente del lavado del material al finalizar la extracción, subrayando la importancia crítica de este paso para asegurar que las microesferas no se pierdan en el proceso. En resumen, estos ejemplos ilustran cómo el lavado con agua desionizada es fundamental para maximizar la recuperación de microplásticos que pueden adherirse a los utensilios utilizados en el proceso de extracción.

Finalmente, la inspección visual de estos filtros revela que el sistema de filtración propuesto permite que el flujo de material pase de manera eficiente a través del centro del filtro. Debido a que se ha observado que las microesferas tienden a desplazarse hacia las orillas del filtro durante el proceso, es de suma importancia evitar que estos se saturen de líquido. Para mitigar esta tendencia y evitar la pérdida de partículas, es crucial realizar una filtración lenta que permita un asentamiento más uniforme y una captura más completa de las microesferas. Adicionalmente, el uso de la centrífuga en el proceso ha demostrado ser ventajoso, ya que, en cuestión de horas, el NaI no se oxida ni tiñe los filtros de amarillo, evitando interferencias en la lectura y facilitando la inspección visual. Esto asegura que el material filtrado se mantenga claro y permite una evaluación más precisa de las partículas recuperadas. En conjunto, estas consideraciones resaltan la importancia de ajustar el proceso de filtración para optimizar la recuperación y facilitar el análisis de los microplásticos.

Capítulo 5. Conclusiones

Las modificaciones a la metodología inicial de REMARCO muestran una mejora significativa en la recuperación de microplásticos en comparación con el protocolo original. Inicialmente, el método REMARCO mostró una recuperación promedio de solo $10\% \pm 3\%$, lo que sugiere que la metodología podría no ser adecuada para la naturaleza de los sedimentos de la llanura abisal y la plataforma continental del Golfo de México. Sin embargo, mediante la modificación y optimización del proceso, incluyendo la centrifugación y el uso de diferentes reactivos, se logró un incremento considerable en la recuperación de microplásticos.

Los ensayos realizados demostraron que el yoduro de sodio (NaI) es más eficiente en la separación de microplásticos en comparación con el cloruro de sodio (NaCl), sin embargo, la combinación de ambos reactivos resultó ser el procedimiento óptimo, alcanzando un porcentaje de recuperación promedio del $89\% \pm 6\%$ y un porcentaje de recuperación de 96% al ser comprobada analizando la muestra provista por el laboratorio MEL de la IAEA. Estos resultados indican que el método combinado es eficiente, reproducible, con un gasto menor de tiempo y recursos proporcionando una alternativa viable para mejorar el análisis de microplásticos en sedimentos marinos.

El lavado con agua desionizada demostró ser crucial para recuperar microplásticos que podrían haber permanecido adheridos a las paredes de los utensilios durante el proceso de extracción. Los ejemplos analizados confirmaron que una mayor proporción de microesferas se recuperó en los filtros posteriores al lavado con agua desionizada, subrayando la importancia de este paso para optimizar la recuperación global.

El sistema de filtrado y la implementación de la centrifuga también contribuyeron a mejorar la eficiencia del proceso, ya que esta técnica permitió un procesamiento más rápido y evitó la oxidación del yoduro de sodio, facilitando una inspección más precisa de los filtros.

En resumen, los ajustes realizados a la metodología original, incluyendo el uso de yoduro de sodio y cloruro de sodio, la centrifugación y el lavado con agua desionizada, han demostrado ser efectivos para mejorar la recuperación de microplásticos en muestras de sedimento marino. Los resultados obtenidos con la metodología propuesta indican que es posible optimizar el proceso con modificaciones puntuales para lograr una recuperación más alta y eficiente. Futuros estudios podrían beneficiarse de la evaluación de

microplásticos de diferentes tamaños y composición para validar y ajustar aún más la metodología, asegurando su aplicabilidad en diversos contextos y condiciones de muestreo.

Literatura citada

- Andrady, A. L., & Neal, M. A. (2009). Applications and societal benefits of plastics. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 364(1526), 1977-1984. <https://doi.org/10.1098/rstb.2008.0304>
- Bellasi, A., Binda, G., Pozzi, A., Boldrocchi, G., & Bettinetti, R. (2021). The extraction of microplastics from sediments: An overview of existing methods and the proposal of a new and green alternative. *Chemosphere*, 278, 130357. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2021.130357>
- Constant, M., Billon, G., Breton, N., & Alary, C. (2021). Extraction of microplastics from sediment matrices: Experimental comparative analysis. *Journal of Hazardous Materials*, 420, 126571. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2021.126571>
- Coppock, R. L., Cole, M., Lindeque, P. K., Queirós, A. M., & Galloway, T. S. (2017). A small-scale, portable method for extracting microplastics from marine sediments. *Environmental Pollution*, 230, 829-837. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2017.07.017>
- Díaz-Asencio, M., Bartrina, V. F., & Herguera, J. C. (2019). Sediment accumulation patterns on the slopes and abyssal plain of the southern Gulf of Mexico. *Deep Sea Research Part I: Oceanographic Research Papers*, 146, 11-23. <https://doi.org/10.1016/j.dsr.2019.01.003>
- Enet, P. (2022). *Addressing marine litter and microplastics, UN system-wide contributions A Synthesis Report* (p. 143). United Nations Environment Management Group. https://unemg.org/wp-content/uploads/2022/01/UNEP_EMG-REPORT_Marine-Litter-Microplastics.pdf
- Grelaud, M., & Ziveri, P. (2020). The generation of marine litter in Mediterranean island beaches as an effect of tourism and its mitigation. *Scientific Reports*, 10(1), 20326. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-77225-5>
- He, D., Zhang, X., & Hu, J. (2021). Methods for separating microplastics from complex solid matrices: Comparative analysis. *Journal of Hazardous Materials*, 409, 124640. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2020.124640>
- Herzka, S. Z., Zaragoza Álvarez, R. A., Peters, E. M., & Hernández Cárdenas, G. (Eds.) (with Chi Chan, M. Y., & Arias Torres, A. P.). (2021). *Atlas de línea base ambiental del Golfo de México*. CICESE Carretera.
- Hidalgo-Ruz, V., Gutow, L., Thompson, R. C., & Thiel, M. (2012). Microplastics in the Marine Environment: A Review of the Methods Used for Identification and Quantification. *Environmental Science & Technology*, 46(6), 3060-3075. <https://doi.org/10.1021/es2031505>
- Hopewell, J., Dvorak, R., & Kosior, E. (2009). Plastics recycling: Challenges and opportunities. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 364(1526), 2115-2126. <https://doi.org/10.1098/rstb.2008.0311>
- Imhof, H. K., Ivleva, N. P., Schmid, J., Niessner, R., & Laforsch, C. (2013). Contamination of beach sediments of a subalpine lake with microplastic particles. *Current Biology*, 23(19), R867-R868. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2013.09.001>

- Imhof, H. K., Schmid, J., Niessner, R., Ivleva, N. P., & Laforsch, C. (2012). A novel, highly efficient method for the separation and quantification of plastic particles in sediments of aquatic environments. *Limnology and Oceanography: Methods*, 10(7), 524-537. <https://doi.org/10.4319/lom.2012.10.524>
- Martínez-López, B., & Zavala-Hidalgo, J. (2009). Seasonal and interannual variability of cross-shelf transports of chlorophyll in the Gulf of Mexico. *Journal of Marine Systems*, 77(1-2), 1-20. <https://doi.org/10.1016/j.jmarsys.2008.10.002>
- Mohamed Nor, N. H., & Obbard, J. P. (2014). Microplastics in Singapore's coastal mangrove ecosystems. *Marine Pollution Bulletin*, 79(1-2), 278-283. <https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2013.11.025>
- Mufarrij, F., Ashrafi, O., Navarri, P., & Khojasteh, Y. (2023). Development and lifecycle assessment of various low- and high-density polyethylene production processes based on CO2 capture and utilization. *Journal of Cleaner Production*, 414, 137624. <https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2023.137624>
- Muller-Karger, F. E., Smith, J. P., Werner, S., Chen, R., Roffer, M., Liu, Y., Muhling, B., Lindo-Atichati, D., Lamkin, J., Cerdeira-Estrada, S., & Enfield, D. B. (2015). Natural variability of surface oceanographic conditions in the offshore Gulf of Mexico. *Progress in Oceanography*, 134, 54-76. <https://doi.org/10.1016/j.pocean.2014.12.007>
- Murawski, S. A., Hollander, D. J., Gilbert, S., & Gracia, A. (2020). Deepwater Oil and Gas Production in the Gulf of Mexico and Related Global Trends. En S. A. Murawski, C. H. Ainsworth, S. Gilbert, D. J. Hollander, C. B. Paris, M. Schlüter, & D. L. Wetzel (Eds.), *Scenarios and Responses to Future Deep Oil Spills* (pp. 16-32). Springer International Publishing. https://doi.org/10.1007/978-3-030-12963-7_2
- Napper, I. E., & Thompson, R. C. (2020). Plastic Debris in the Marine Environment: History and Future Challenges. *Global Challenges*, 4(6), 1900081. <https://doi.org/10.1002/gch2.201900081>
- Niu, H., Liu, S., Jiang, Y., Hu, Y., Li, Y., He, L., Xing, M., Li, X., Wu, L., Chen, Z., Wang, X., & Lou, X. (2023). Are Microplastics Toxic? A Review from Eco-Toxicity to Effects on the Gut Microbiota. *Metabolites*, 13(6), 739. <https://doi.org/10.3390/metabo13060739>
- Oliveira, J., Belchior, A., Da Silva, V. D., Rotter, A., Petrovski, Ž., Almeida, P. L., Lourenço, N. D., & Gaudêncio, S. P. (2020). Marine Environmental Plastic Pollution: Mitigation by Microorganism Degradation and Recycling Valorization. *Frontiers in Marine Science*, 7, 567126. <https://doi.org/10.3389/fmars.2020.567126>
- Pham, T.-H., Do, H.-T., Phan Thi, L.-A., Singh, P., Raizada, P., Chi-Sheng Wu, J., & Nguyen, V.-H. (2021). Global challenges in microplastics: From fundamental understanding to advanced degradations toward sustainable strategies. *Chemosphere*, 267, 129275. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2020.129275>
- Rivoira, L., Castiglioni, M., Rodrigues, S. M., Freitas, V., Bruzzoniti, M. C., Ramos, S., & Almeida, C. M. R. (2020). Microplastic in marine environment: Reworking and optimisation of two analytical protocols for the extraction of microplastics from sediments and oysters. *MethodsX*, 7, 101116. <https://doi.org/10.1016/j.mex.2020.101116>

- Rogers, K. L., Carreres-Calabuig, J. A., Gorokhova, E., & Posth, N. R. (2020). Micro-by-micro interactions: How microorganisms influence the fate of marine microplastics. *Limnology and Oceanography Letters*, 5(1), 18-36. <https://doi.org/10.1002/lol2.10136>
- Simon-Sánchez, L., Grelaud, M., Garcia-Orellana, J., & Ziveri, P. (2019). River Deltas as hotspots of microplastic accumulation: The case study of the Ebro River (NW Mediterranean). *Science of The Total Environment*, 687, 1186-1196. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2019.06.168>
- Stile, N., Raguso, C., Pedruzzi, A., Cetojevic, E., Lasagni, M., Sanchez-Vidal, A., & Saliu, F. (2021). Extraction of microplastic from marine sediments: A comparison between pressurized solvent extraction and density separation. *Marine Pollution Bulletin*, 168, 112436. <https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2021.112436>
- Van Sebille, E., Aliani, S., Law, K. L., Maximenko, N., Alsina, J. M., Bagaev, A., Bergmann, M., Chapron, B., Chubarenko, I., Cózar, A., Delandmeter, P., Egger, M., Fox-Kemper, B., Garaba, S. P., Goddijn-Murphy, L., Hardesty, B. D., Hoffman, M. J., Isobe, A., Jongedijk, C. E., ... Wichmann, D. (2020). The physical oceanography of the transport of floating marine debris. *Environmental Research Letters*, 15(2), 023003. <https://doi.org/10.1088/1748-9326/ab6d7d>
- Waldschläger, K., Brückner, M. Z. M., Carney Almroth, B., Hackney, C. R., Adyel, T. M., Alimi, O. S., Belontz, S. L., Cowger, W., Doyle, D., Gray, A., Kane, I., Kooi, M., Kramer, M., Lechthaler, S., Michie, L., Nordam, T., Pohl, F., Russell, C., Thit, A., ... Wu, N. (2022). Learning from natural sediments to tackle microplastics challenges: A multidisciplinary perspective. *Earth-Science Reviews*, 228, 104021. <https://doi.org/10.1016/j.earscirev.2022.104021>
- Wang, J., Wang, M., Ru, S., & Liu, X. (2019). High levels of microplastic pollution in the sediments and benthic organisms of the South Yellow Sea, China. *Science of The Total Environment*, 651, 1661-1669. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2018.10.007>
- Xia, Y., Zhou, J.-J., Gong, Y.-Y., Li, Z.-J., & Zeng, E. Y. (2020). Strong influence of surfactants on virgin hydrophobic microplastics adsorbing ionic organic pollutants. *Environmental Pollution*, 265, 115061. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2020.115061>
- Zhang, D., Liu, X., Huang, W., Li, J., Wang, C., Zhang, D., & Zhang, C. (2020)a. Microplastic pollution in deep-sea sediments and organisms of the Western Pacific Ocean. *Environmental Pollution*, 259, 113948. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2020.113948>
- Zhang, X., Yu, K., Zhang, H., Liu, Y., He, J., Liu, X., & Jiang, J. (2020)b. A novel heating-assisted density separation method for extracting microplastics from sediments. *Chemosphere*, 256, 127039. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2020.127039>

Anexos

Anexo A

Metodología para la extracción de microplásticos en sedimentos marinos

Materiales

Soporte universal

Pinzas para sujetar la pipeta al soporte universal

Matraz kitazato

Embudo buchner

Vasos de precipitado de 50 ml

Pipetas de vidrio graduadas de 10 ml

Propipeta

Tubos de ensayo de vidrio para centrifugar

Filtros de poro de 10um *de cuarzo o de metal

Equipo

Bomba de vacío

Plato de calentamiento

Agitador

Baño ultrasonido

Centrifuga

Estufa

Mufla

Reactivos

Solución saturada de NaI (densidad de 1.6 g/ml)

Solución saturada de NaCl (densidad de 1.2 g/ml)

Tritón X-100

Agua desionizada

H₂O₂

Etapas

1. Preparación del material y el área de trabajo
2. Toma de muestra
3. Eliminación de la materia orgánica
4. Extracción de microplásticos mediante separación utilizando soluciones salinas saturadas
5. Filtrado de sobrenadantes de las extracciones de microplásticos con soluciones salinas saturadas
6. Limpieza del material de vidrio
7. Lectura de los filtros

Diagrama de Flujo

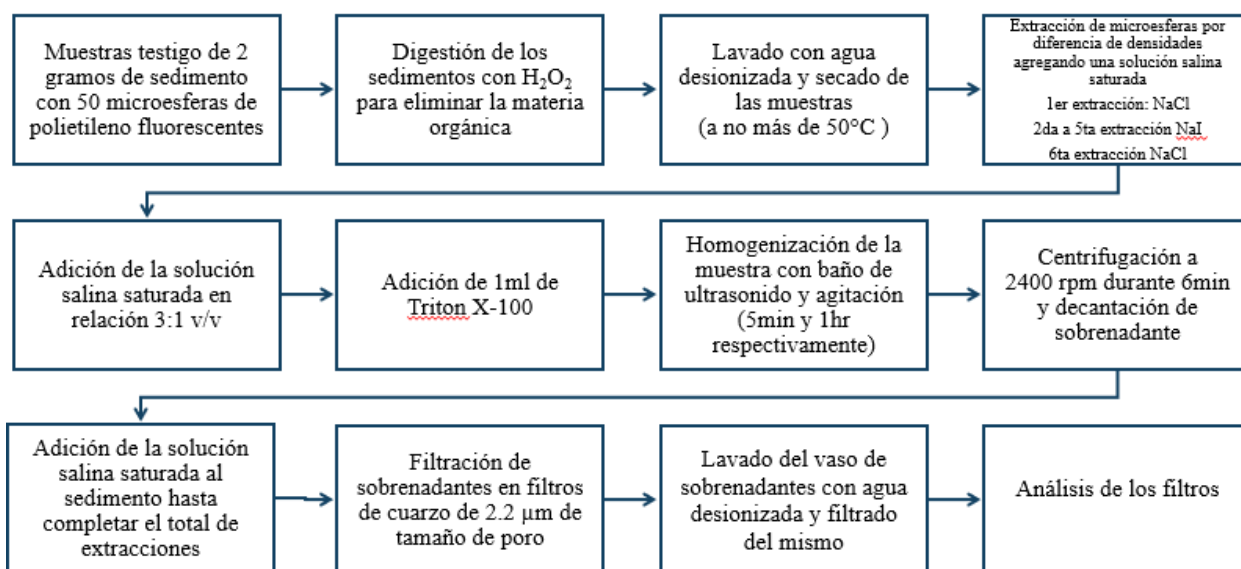


Figura 9 Diagrama de flujo para la metodología para la extracción de microplásticos en sedimentos marinos

1. Preparación del material y el área de trabajo

Todo el material que será utilizado es lavado y secado previo a su uso. El material de vidrio, como los vasos de precipitado que contendrán las muestras, es calentado a 400°C por 4 horas en una mufla para eliminar cualquier posible contaminación.

Desde la toma de la muestra hasta que finaliza su manejo, se trabaja en un lugar cerrado, preferiblemente en una cabina de flujo laminar o en una campana de extracción que evite la contaminación por microplásticos del ambiente por gravedad. Así mismo durante todo el procedimiento se deberá trabajar utilizando solamente ropa de algodón.

Durante todo el procedimiento se evita por completo el uso de cualquier material de plástico que pueda contaminar la muestra. Para reducir dicha contaminación al máximo, se hace un blanco por cada 10 muestras, el cual es manejado de la misma manera que las muestras para restar los microplásticos capturados del ambiente en el resultado final obtenido en las muestras.

2. Toma de muestra

Se toman 2g de muestra húmeda de sedimento marino y se trasvasan a un vaso de precipitados de 50ml. Una vez que la muestra de sedimento es trasvasada al vaso de precipitados, se tapa con papel aluminio y se refrigera inmediatamente hasta que se inicie su procesamiento.

3. Eliminación de la materia orgánica

A la muestra de sedimento se le agrega no más de 5ml de H_2O_2 al 20% de forma lenta y por goteo, cuidando que las burbujas no se expandan por fuera del vaso de precipitado, ocasionando la pérdida de muestra. La solución con el sedimento se deja reaccionar, observando el burbujeo que indica la eliminación de la materia orgánica. Se deja reposar hasta que el burbujeo se detenga, lo cual puede tardar más de 24 horas dependiendo de la cantidad de materia orgánica presente. Una vez que no se observan más burbujas, no más de 5ml de H_2O_2 al 20% se añaden nuevamente de forma lenta y por goteo, repitiendo el procedimiento las veces que sean necesarias hasta que la solución de H_2O_2 al 20% se añada y ya no se observen burbujas indicando que se eliminó toda la materia orgánica presente en la muestra.

Una vez que se deje de añadir la solución de H_2O_2 , las paredes del vaso se lavan con agua desionizada para evitar que el sedimento se adhiera a estas. Posteriormente, la muestra se seca para evaporar los restos de H_2O_2 al 20%. Cuando la muestra sedimenta en el vaso y el sobrenadante se ha evaporado casi en su totalidad, se añaden 5ml de agua desionizada para asegurar que los restos de H_2O_2 al 20% se evaporen por completo.

4. Extracción de microplásticos mediante separación utilizando soluciones salinas saturadas

Una vez que la muestra este húmeda, sin ningún sobrenadante y a temperatura ambiente se agrega la solución saturada de NaCl en una proporción de 3:1 v/v (3ml de solución salina saturada por cada ml de sedimento húmedo). Adicionalmente se agrega 1 ml de Tritón X-100 y se lleva por 5 minutos al baño de ultrasonido para asegurar que la solución salina y el surfactante penetran en la muestra de sedimento.

Pasados los 5 minutos la muestra se lleva a agitación por 1 hora.

Pasada la hora de agitación la muestra se trasvasa a un tubo de ensayo de vidrio con tapa y se centrifuga por 6min a 2100rpm. Se trasvasa por decantación el sobrenadante a un nuevo vaso de precipitados limpio denominado "Vaso de Sobrenadantes", el sedimento restante en el tubo de ensayo se devuelve al vaso inicial añadiendo nuevamente la solución salina saturada, en el caso del segundo lavado utilizando la solución saturada de NaI, cuidando que sea el mismo volumen utilizado anteriormente respetando la relación 3:1 v/v.

Se añaden nuevamente 1ml de Tritón X 100 dejándolo caer al vaso por las paredes para bajar todo el sedimento y posibles microplásticos que se hayan quedado adheridos al vaso. Se repite nuevamente el

proceso desde los 5 min de baño de ultrasonido hasta la decantación del sobrenadante resultante de la segunda extracción. Se realizan en total 5 extracciones siguiendo el procedimiento anteriormente detallado, siendo la primer y ultima extracción con NaCl y el resto con NaI, siempre colocando los sobrenadantes en el “Vaso de sobrenadantes”.

Al hacer la última extracción con NaCl, se debe hacer una limpieza de las paredes del primer vaso de precipitado con la misma solución para asegurar que no quedan restos de muestra ni de posibles microplásticos en las paredes del vaso de precipitado. El sedimento debe quedar al final en el tubo de ensayo.

5. Filtrado de sobrenadantes de las extracciones de microplásticos con soluciones salinas saturadas.

Para llevar a cabo la filtración de los sobrenadantes se monta un sistema de filtración al vacío, para lo cual se coloca el embudo Buchner sobre el matraz Kitasato, se debe asegurar el vacío por lo que es recomendable cubrir la unión del embudo y el matraz con Parafilm® para evitar pérdida de presión por fugas. La filtración se debe llevar a cabo por goteo por lo que se recomienda colocar un soporte universal que sostenga la pipeta que contendrá el sobrenadante y con ayuda de una propipeta asegurar la caída del sobrenadante de manera lenta y en el centro del filtro. Así mismo es de suma importancia tapar el embudo dejando solamente el espacio para la pipeta para evitar cualquier contaminación ambiental.

Una vez que se tiene el sistema de filtrado montado, se toma la muestra del “Vaso de sobrenadantes” y se filtran los sobrenadantes de las 5 extracciones. Es recomendable realizar el filtrado conforme van siendo decantados los sobrenadantes para evitar la oxidación de las sales, de lo contrario se deben refrigerar hasta que sean filtrados.

6. Limpieza del material de vidrio

Una vez finalizadas las extracciones, al primer vaso de precipitado que debería quedar completamente vacío se le realiza un último lavado con agua desionizada para asegurar que ningún micro plástico permanezca en las paredes. Así mismo se realiza un último lavado al “Vaso de sobrenadantes” ya que todos los sobrenadantes fueron filtrados. Ambos lavados con agua desionizada se hacen dejando caer el agua por las paredes para que arrastrar posibles microplásticos, se recomienda inclinar el vaso para concentrar el lavado resultante en la menor superficie posible del vaso, el cual será finalmente tomado con la misma pipeta graduada con la que se testa trabajando.

Finalmente, a la misma pipeta graduada se le hará un lavado final con agua desionizada dejando caer gotas de agua desionizada por la parte superior para asegurar el arrastre de todos los posibles micro plásticos

que pudieran haber permanecido pegados a las paredes durante el filtrado. Y por último se recomienda dejar caer algunas gotas en la punta de la pipeta que estuvo en contacto exterior con los sobrenadantes. Estos últimos lavados son de suma importancia para evitar la pérdida de micro plásticos que pudieran quedar adheridas a las superficies del material con el cual se trabajó durante todo el procedimiento.

7. Lectura del filtro

Dependiendo de las necesidades del análisis de los microplásticos obtenidos deberá ser la naturaleza del filtro, para que este sea posteriormente analizado.