

INSTITUTO TECNOLÓGICO DE COSTA RICA

ESCUELA DE QUÍMICA

CARRERA DE INGENIERÍA AMBIENTAL

Proyecto Final de Graduación para optar por el grado de Licenciatura en Ingeniería  
Ambiental

**“Determinación de microplásticos en especies marinas del Parque Nacional Marino  
Las Baulas”**

María Angélica Astorga Pérez

CARTAGO, Agosto, 2020

**TEC** | Tecnológico de Costa Rica  
Ingeniería Ambiental



## **“Determinación de microplásticos en especies marinas en el Parque Nacional Marino Las Baulas”**

Informe presentado a la Escuela de Química del Instituto Tecnológico de Costa Rica como requisito parcial para optar por el título de Ingeniero Ambiental con el grado de licenciatura

### **Miembros del tribunal**

---

**Ph.D. Lilliana Abarca Guerrero**  
**Directora**

---

**Ph.D. Karol Ulate Naranjo**  
**Co-Directora**

---

**M.Sc. Michael Hernández Miranda**  
**Lector 2**

---

**M.Sc.Eng. Diana Zambrano Piamba**  
**Coordinadora COTRAFIG**

---

**M.Sc. Ricardo Coy Herrera**  
**Director Escuela de Química**

---

**M.Sc. Ana Lorena Zúñiga**  
**Coordinadora Carrera de Ingeniería Ambiental**



## **DEDICATORIA**

“You know, I love being around people that help me see the world through a new pair of glasses

And Rick, you’re one of those people”

## **AGRADECIMIENTOS**

A la vida por permitirme experimentar a través de esta tesis una montaña rusa de aprendizaje académico, personal, familiar y laboral.

A los profesores Allen Puente Urbina por impulsarme a soñar en grande y terminar en China, por recibir un par de llamadas al otro lado del mundo y escuchar. Eric Romero por la paciencia y la calidez de respuesta ante cualquier duda. Diana Zambrano por la comprensión, complicidad y arduo trabajo.

A Alejandro Miranda por ser un amigo incondicional, una gran escucha durante tantos años universitarios y momentos puntuales.

A Michael Hernández Miranda por la preocupación, honestidad y guía genuina durante este proceso.

A Valeria Navarro Cascante por ser una sonrisa en medio de la incertidumbre y presión.

A Félix Torrez Martínez por ser mi amistad más atípica y hacerme creer en mi potencial.

A Marta Cordero Sánchez por darme un nuevo hogar.

A Karol Ulate Naranjo, Fausto Arias Zumbado y Jorge Valerio Vargas por mostrarme una nueva galaxia.

Finalmente, a Lilliana Abarca Guerrero, por iluminar mis días, preocupaciones y dudas. Por demostrarme a lo largo de los años la definición de “pasión”, a romper mis propios paradigmas y convertirse en una aspiración personal.

Este proyecto no pudo haber sido desarrollado sin la ayuda interinstitucional. Específicamente le doy las gracias al Laboratorio Nacional de Nanotecnología (LANOTEC)

por su apoyo metodológico; a la Escuela de Física del Instituto Tecnológico por la ayuda con los análisis Raman; a la Escuela de Ciencias Biológicas de la Universidad Nacional, por la prestación de sus instalaciones y materiales de trabajo, más específicamente al Laboratorio de Biotecnología de Docencia (LABID), Laboratorio de Histología y Laboratorio de Estudios Marino Costeros (LEMACO). Gracias a los financiadores para la obtención de muestras: Environmental Science and Resource Management Program de California State University Channel Islands y al Great Basin Institute de Reno, Nevada. También agradecemos al Sistema Nacional de Áreas de Conservación (SINAC), específicamente al Área de Conservación Tempisque por el otorgamiento de los permisos de investigación para la extracción de las muestras, bajo los permisos: ACT-OR-DR-021-2019 y ACT-OR-DR-019-2020.

## TABLA DE CONTENIDO

<b>1</b>	<b>INTRODUCCIÓN</b>	<b>1</b>
<b>2</b>	<b>OBJETIVOS</b>	<b>2</b>
2.1.1	Objetivo general	2
2.1.2	Objetivos específicos	2
<b>3</b>	<b>REVISIÓN DE LITERATURA</b>	<b>3</b>
3.1	Generalidades de los microplásticos	3
3.2	Estudios previos de microplásticos	4
3.3	Antecedentes sobre microplásticos en costa rica	9
3.4	Métodos reportados en la literatura para determinar microplásticos	10
3.4.1	Métodos para determinar microplásticos en biota	10
3.4.2	Muestreo	11
3.4.3	Extracción de los microplásticos	11
3.4.4	Identificación fisicoquímica de los microplásticos	12
3.5	Efecto de los microplásticos en zonas de conservación	15
<b>4</b>	<b>MATERIALES Y MÉTODOS</b>	<b>18</b>
4.1	Caso de estudio	18
4.1.1	Extracción y preparación de los peces recolectados para su posterior análisis químico e histológico	20
4.1.2	Extracción y preparación de los crustáceos recolectados para su posterior análisis químico e histológico	21
4.2	Extracción de los microplásticos del sistema digestivo de los peces y cefalotórax de los crustáceos	22
4.3	Identificación fisicoquímica de las partículas extraídas de los individuos analizados	25

4.4	Determinación de microplásticos en tejido muscular de crustáceos y peces mediante histología	31
4.4.1	Fijación de las muestras de tejidos musculares de peces y jaibas	31
4.4.2	Preparación de las muestras	32
4.4.3	Inclusión en parafina	32
4.4.4	Formación del bloque de parafina	33
4.4.5	Microtoma (obtención de cortes histológicos)	33
4.4.6	Proceso de coloración/tinción	33
4.4.7	Observación de las láminas en el microscopio y análisis de resultados	35
<b>5</b>	<b>RESULTADOS Y DISCUSIÓN</b>	<b>36</b>
5.1	Estimación del microplástico presente en los sistemas digestivos de las especies marinas muestreadas	36
5.2	Identificación de las partículas extraídas	44
5.3	Determinación de presencia de microplásticos en lesiones en el tejido muscular por medio de histología	51
5.4	Evaluación de la metodología empleada y los cambios realizados	55
<b>6</b>	<b>CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES</b>	<b>61</b>
<b>7</b>	<b>REFERENCIAS</b>	<b>65</b>
<b>8</b>	<b>APÉNDICES</b>	<b>73</b>
8.1	Apéndice 1: procesamiento de las muestras	73
8.2	Apéndice 2: identificación de las partículas extraídas	83
8.3	Apéndice 3: proceso de histología	84
8.4	Apéndice 4: pruebas estadísticas realizadas	86



## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 3.1</b> Metodologías disponibles para determinar MPs .....	10
<b>Figura 4.1</b> Área de estudio con los límites del área protegida del PNMB. Estrellas amarillas marcan los sectores en donde se recolectan las muestras. ....	19
<b>Figura 4.2</b> Técnicas utilizadas según el tipo de tejido y organismo por analizar. ....	20
<b>Figura 4.3</b> Medidas morfológicas de un pez. ....	21
<b>Figura 4.4</b> Método visual para determinar el sexo de cada jaiba. ....	21
<b>Figura 4.5</b> Medidas morfológicas de la jaiba. ....	22
<b>Figura 4.6</b> Metodología aplicada para extraer e identificar MPs en el sistema digestivo de peces y jaibas .....	30
<b>Figura 5.1</b> Cantidad de individuos analizados y su frecuencia de ocurrencia de MPs obtenida en el sistema digestivo.....	38
<b>Figura 5.3.</b> Cantidad de organismos analizados según su familia y su ocurrencia de ingesta de MPs .....	40
<b>Figura 5.4.</b> Talla promedio de las especies analizadas vs su correspondiente Talla MAD .....	42
<b>Figura 5.5.</b> Longitud del cefalotórax de las jaibas vs la cantidad de MPs extraídos.....	43
<b>Figura 5.6.</b> Longitud total de los pargos y la cantidad de MPs extraídos del sistema digestivo .....	43
<b>Figura 5.2</b> MPs extraídos en el sistema digestivo según el organismo muestreado.....	45
<b>Figura 5.7</b> Imagen obtenida por SEM de la muestra F23.1 .....	46
<b>Figura 5.8</b> Imagen obtenida por SEM de la muestra F23.2 .....	47
<b>Figura 5.9</b> Imagen obtenida por SEM de la muestra F23.3 .....	47
<b>Figura 5.10</b> Imagen obtenida por SEM de la muestra F23.4.....	47

<b>Figura 5.11</b> Espectro obtenido de una pieza aislada de una jaiba (muestra con código C38.1) .....	49
<b>Figura 5.12</b> Resultados de la comparación de señales espectrales con la base de datos ....	49
<b>Figura 5.13</b> Espectro con alta fluorescencia obtenido de una pieza aislada de una jaiba (código C38.1) .....	50
<b>Figura 5.14</b> Espectro con ruido de fondo obtenido de la pieza aislada del sistema digestivo de un pez (código F35).....	51
<b>Figura 5.15</b> Metodología adecuada para realizar procesar el tejido muscular mediante histología .....	53
<b>Figura 5.16</b> Fibrosis en el tejido muscular de un pez <i>Lutjanus novemfasciatus</i> .....	54
<b>Figura 5.17</b> Congestión en el tejido muscular de un pez <i>Lutjanus colorado</i> .....	54
<b>Figura 5.18</b> Inflamación en el tejido muscular de un pez <i>Lutjanus colorado</i> .....	55

## LISTA DE CUADROS

<b>Cuadro 3.1</b> Densidad específica de los plásticos más comunes y el agua de mar.....	4
<b>Cuadro 3.2</b> Estudios recientes de la contaminación de MPs en biota .....	7
<b>Cuadro 3.3</b> Enfoques de extracción más reportados.....	12
<b>Cuadro 3.4</b> Revisión literaria de los métodos/técnicas para identificar MPs.....	13
<b>Cuadro 3.5</b> Revisión literaria de los métodos químicos para identificar MPs.....	14
<b>Cuadro 3.6</b> Generalidades de las especies de interés comercial en estudio.....	17
<b>Cuadro 4.1</b> Tiempos en las estaciones del procesador de tejidos.....	32
<b>Cuadro 4.2</b> Programación de la cámara de tinción.....	34
<b>Cuadro 5.1.</b> Resultados obtenidos del muestreo de MPs sistemas digestivos de peces y jaibas.....	36
<b>Cuadro 5.2.</b> Reglas para la identificación de MPs.....	<b>Error! Bookmark not defined.</b>
<b>Cuadro 5.3.</b> Características físicas de los MPs encontrados .....	44
<b>Cuadro 5.4.</b> Polímeros sintéticos más comunes y utilizados en la industria textil.....	<b>Error! Bookmark not defined.</b>
<b>Cuadro 5.5</b> Resultados obtenidos por EDS de piezas del sistema digestivo de peces <i>Lutjanus colorado</i> .....	48

## LISTA DE SIGLAS Y ACRÓNIMOS

AFM	Microscopía de fuerza atómica
CENAT	Centro de Alta Tecnología
CIMAR	Centro de Investigación en Ciencias del Mar y Limnología
FEES	Fondo Especial para la Educación Superior
FTIR	Espectroscopía infrarroja por transformada de Fourier
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Peróxido de hidrógeno
HSI	Imágenes hiperespectrales
INCOPESCA	Instituto Costarricense de Pesca y Acuicultura
IRET	Instituto Regional de Estudios en Sustancias Tóxicas
ITCR	Instituto Tecnológico de Costa Rica
KOH	Hidróxido de potasio
LANOTEC	Laboratorio Nacional de Nanotecnología
MP	Microplástico
NTA	Análisis de seguimiento de nanopartículas
PE	Polietileno
PET	Tereftalato de polietileno
PNMB	Parque Nacional Marino las Baulas
PNUD	Programa de Naciones Unidas para el Desarrollo
PP	Polipropileno
PS	Poliestireno
PVC	Policloruro de vinilo
RAMAN	Espectroscopía Raman
SEM-EDS	Microscopía electrónica de barrido acoplada a espectroscopia de energía dispersada
SINAC	Sistema Nacional de Áreas de Conservación
UCR	Universidad de Costa Rica
UNA	Universidad Nacional de Costa Rica

## RESUMEN

Se ha reportado la ingesta de microplásticos en diversas especies marinas, sin embargo, el grado de contaminación en los sistemas y la biota asociada a estos es poco conocido. En este estudio se presentan los resultados de la presencia de microplásticos en siete especies de peces demersales y de una especie de crustáceo bentónico, todos de alto nivel trófico del Parque Nacional Marino Las Baulas.

Mediante digestión química e inspección visual se extrajeron microplásticos del sistema digestivo de 56 individuos. Además, mediante la técnica de histología se evaluó la presencia de microplástico en el tejido muscular y lesiones asociadas a estos. Un total de 90 piezas fueron extraídas del 89% de los peces (93% fibras) con  $3,75 \pm 1,70$  (SD) microplástico/pez. Se obtuvo una cantidad significativamente menor en los crustáceos con un total de 58 piezas extraídas del 76% de los individuos analizados con  $2,64 \pm 1,36$  (CF) microplástico/jaiba. Las pruebas fisicoquímicas mediante SEM/EDS corroboran la presencia de piezas sintéticas con enlaces C-O. Mediante la técnica de histología no se determinan resultados atribuibles a MPs.

Cabe destacar que durante el procesamiento de las muestras se enfrentaron limitaciones metodológicas, por lo tanto, se realiza una última sección en donde se describen estas limitaciones y las formas en que fueron abordadas. Se reporta por primera vez la presencia de estos contaminantes en especies marinas de alto nivel trófico en la costa del Pacífico de Costa Rica lo cual demuestra la importancia de una mejor gestión de los residuos sólidos generados en la población.

**Palabras clave:** Ingesta de microplásticos, Biota, Histología, Microscopía electrónica, Manglar, Zona de conservación

## **ABSTRACT**

The ingestion of microplastics has been reported in various marine species, however, the degree of contamination in the systems and the biota associated with them is little known. This study presents the results of the presence of microplastics in seven species of pelagic fish and one species of benthic crustacean, all of high trophic level from the National Park Marino Las Baulas.

By chemical digestion and visual inspection, microplastics were extracted from the digestive system of 56 individuals. A total of 90 pieces were extracted from 89% of the fish (93% fibers) with  $3.75 \pm 1.70$  (SD) microplastic / fish. A significantly lower quantity was obtained in crustaceans with a total of 58 pieces extracted from 76% of the individuals analyzed with  $2.64 \pm 1.36$  (CF) microplastic / crab. Physicochemical tests using SEM / EDS corroborate the presence of synthetic parts with C-O bonds.

It should be noted that during the processing of the samples methodological limitations were faced, therefore, a final section is made where these limitations and the ways in which they were addressed are described. The presence of these pollutants is reported for the first time in marine species of high trophic level on the Pacific coast of Costa Rica, which shows the importance of a better management of solid waste generated in the population.

**Key words:** Microplastic, Biota, Histology, SEM / EDS, Mangrove

# 1 INTRODUCCIÓN

El plástico es un polímero sintético muy cotizado en la industria debido a su resistencia, versatilidad y bajo costo [1]. Según los registros mundiales, desde el 2014 se producen anualmente más de 300 millones de toneladas de plástico, del cual se estima que un 50% de todo este material termina en el ambiente debido a su mal manejo; y aproximadamente entre 4,8 y 12,7 millones de toneladas métricas acaban en los ecosistemas marinos como microplásticos [2].

Un número sustancial de estudios en microplásticos se han reportado donde se han dado los primeros pasos hacia métodos estandarizados para su detección e identificación de muestras ambientales. Sin embargo, la comparabilidad de los datos se ha visto obstaculizada por una amplia variedad de metodologías, que resultan en la generación de información con diferente calidad y resolución. Se han hecho estudios en muestras de agua, en muestras de sedimentos provenientes de las playas y en sedimentos submareales; y finalmente en la biota marina [3].

A pesar de que existe evidencia de contaminación de microplásticos alrededor del mundo, poco se ha investigado en su impacto en áreas marinas protegidas [4]. Estas áreas tienen como objetivo reducir la degradación de los hábitats y limitar la explotación de recursos. Cabe destacar que casi todos los hábitats marinos están expuestos a la contaminación plástica. Por lo tanto, es importante determinar la infiltración de microplásticos en las redes alimentarias de las costas de las áreas marinas protegidas ubicadas lejos de las ciudades y de las fuentes de contaminación puntuales [5].

En Costa Rica se producen aproximadamente 4000 toneladas diarias de residuos sólidos, de los cuales, el 25% terminan en ríos y playas. Lo cual implica que alrededor de 110 toneladas diarias de plástico se acumulan en el ambiente y la tendencia es que la cifra aumente cada año [6]. En el país se encuentran pocos estudios relacionados con estos contaminantes en los cuerpos acuáticos o en especies marinas. En febrero del 2019, estudiantes de biología de la Universidad de Costa Rica (UCR) informan sobre la presencia de microplásticos en peces filtradores *Clupeidae* en un estudio de biomonitorio [7]. Actualmente, un grupo de investigación en el Centro de Investigación en Ciencias del Mar y Limnología (CIMAR) realiza un estudio de los microplásticos en los ecosistemas marinos. Hasta el momento han obtenido muestras de microplásticos en la arena de cinco playas del Mar Caribe y seis del Océano Pacífico [8]. Por otro lado, la Escuela de Biología Marina de la Universidad Nacional ha realizado muestreos en varias especies de alto nivel trófico y crustáceos, con resultados positivos a la presencia de estas partículas [9]. Este proyecto pretende incrementar el conocimiento sobre la presencia de estos materiales, específicamente en especies marinas comerciales cuyas muestras han sido tomadas de una zona dedicada a la conservación.

## **2 OBJETIVOS**

### **2.1.1 Objetivo general**

Evaluar la presencia de microplásticos en especies marinas presentes en el Parque Nacional Marino Las Baulas.

### **2.1.2 Objetivos específicos**

- Caracterizar por la cantidad y forma, los microplásticos extraídos de los sistemas digestivos de muestras de peces y crustáceos, por medio de digestiones químicas.
- Identificar el tipo de plástico extraído según sus características físicas (color, tamaño y forma) y mediante pruebas fisicoquímicas.
- Examinar la presencia de microplásticos y lesiones asociadas a estos contaminantes en el tejido muscular de peces y crustáceos mediante la técnica de histología.



### 3 REVISIÓN DE LITERATURA

#### 3.1 GENERALIDADES DE LOS MICROPLÁSTICOS

El continuo aumento de la producción de plástico y la mala gestión de sus residuos han provocado un enorme aumento de estos en los sistemas acuáticos, atmosféricos y terrestres [22].

Actualmente los plásticos sintéticos más usados mundialmente son el polietileno de baja y alta densidad (LDPE/HDPE), polipropileno (PP), policloruro de vinilo (PVC), poliestireno (PS) y tereftalato de polietileno (PET). Este conjunto de plásticos representa aproximadamente el 90% de la producción mundial [10]. Por lo que, se cree que la mayoría de los contaminantes en las zonas costeras y en el ecosistema marino están compuestos de estos materiales. Estos residuos pueden ser transportados al ambiente marino en grandes o pequeñas dimensiones [11].

Los microplásticos (MPs) se definen como cualquier partícula sólida sintética o de una matriz polimérica, con un rango de tamaño entre 1  $\mu\text{m}$  a 5 mm [12]. Estos consisten en partículas manufacturadas de dimensiones microscópicas consideradas fuentes primarias; como pellets utilizados en la industria y aplicaciones domésticas. Las fuentes secundarias son aquellos que se forman debido a las condiciones climáticas y la fragmentación de plásticos de mayor dimensión [12]–[14]. Los tipos de polímeros más utilizados mencionados previamente tienen alto peso molecular y no son biodegradables. Dentro del ecosistema marino comienzan a sufrir degradación foto-oxidativa por la irradiación solar ultravioleta (UV), seguido de degradación térmica y/o química [11], [15]. Los MPs cubren un rango de tamaño que difiere hasta 500 veces. A pesar de la mejora continua en los métodos de muestreo, extracción y análisis, la extracción de MPs pequeños ( $< 500 \mu\text{m}$ ) de varias matrices ambientales continúa consumiendo mucho tiempo y persiste una falta de estándares [16].

Los MPs se encuentran distribuidos en los cinco compartimentos marinos principales: en la superficie marina, en las capas mezcladas por la acción del oleaje, en la columna de agua, en el suelo marino, y en la biota [17]. Diversos estudios han reportado la ingesta de MPs por organismos marinos *in situ* y en laboratorio. La ingesta activa (alimentación por filtración o confusión de presa) y la ventilación son consideradas las vías de ingesta de MPs en la fauna marina [18], [19]. Por lo tanto, la biota representa una importante forma de almacenamiento y mecanismo de transporte para los MPs.

Los procesos biológicos y su interacción son los procesos físicos que influyen en la forma de transporte y de los MPs y su diferencia entre los hábitats marinos. Así como las propiedades de las partículas de los MPs influyen en su distribución e interacción con estos procesos

biológicos [20]. En el caso del polipropileno (un plástico común utilizado en la ropa), tiene una densidad de  $0.9 \text{ g/cm}^3$ , lo cual lo hace flotar en agua marina (densidad de  $1.2 \text{ g/cm}^3$ ) y es más probable que especies pelágicas lo ingieran. MPs como el PVC y PET son más densos, por lo que es más probable que se hundan y estén disponibles para los organismos bentónicos [21]. En el cuadro 3.1 se presentan las densidades de los plásticos más comunes.

**Cuadro 3.1** Características de los plásticos más comunes y el agua de mar [11]

<b>Categorías</b>	<b>Densidad específica (<math>\text{g/cm}^3</math>)</b>	<b>Flotabilidad</b>
Poliétileno de baja densidad (PE)	0.91-0.94	Flotante
Polipropileno (PP)	0.90-0.92	
Poliestireno expandido (PS)	0.01-1.05	
Agua de mar	~1.02	
Poliestireno (PS)	1.04-1.09	Sumergible
Policloruro de vinilo flexible (PVC)	1.16-1.30	
Poliamida o nylon	1.13-1.15	
Poliétertereftalato (PET)	1.34-1.39	
Resina de poliéster + fibra de vidrio	>1.35	
Acetato de celulosa	1,22-1,24	

### 3.2 ESTUDIOS PREVIOS DE MICROPLÁSTICOS

Los océanos son considerados los botaderos finales de los MPs ya que estos son un componente significativo en los escombros marinos [23]. Monitorear la abundancia, densidad y distribución de estos contaminantes en el ecosistema marino es difícil debido a su variabilidad espacial y temporal [1]. A pesar de esto, la mayoría de la investigación científica se ha enfocado en la concurrencia de los MPs en este ecosistema.

De acuerdo a una reciente revisión de la literatura [19], se han reportado MPs en el Océano Atlántico, Océano Pacífico, el Polo Ártico, así como en los mares del Norte, Adriático y Bohai, en el sur de China, entre otros. Las fibras son la forma de MP predominante encontrado en los sedimentos marinos [24], aguas superficiales y en la columna de agua [25], así como en la biota [26]–[31]. En las aguas polares del Ártico este porcentaje aumenta a un 95% de predominancia [32]. En estudios se sugiere que esta alta proporción de fibras sintéticas pueden provenir del agua residual de lavanderías [24]. Seguidamente de las fibras, se encuentran los fragmentos, usualmente incluyen PP, PE y PS. En los últimos estudios se releva una relación entre el tipo y el tamaño de polímero, al observar que mientras el tamaño de los plásticos disminuye, el porcentaje de PP aumenta, por el contrario, los porcentajes de PE y PS disminuyen [19].

La ingesta de MPs en los organismos marinos representa una preocupación en aumento debido a los riesgos toxicológicos asociados con estas micropartículas [19]. Existen muchos estudios en donde se ha comprobado la ingesta de MPs al identificar diferentes tipos de partículas de polímeros en los intestinos y estómagos de varios organismos, como el zooplancton [33], mariscos [34] (incluyendo mejillones, ostras, almejas y cangrejos), coral [35], peces [36] y mamíferos marinos [37].

Otros estudios han encontrado MPs en órganos no relacionados con el tracto digestivo y que no participan en la digestión, como en las branquias de jaibas [38] y órganos como el hígado en peces demersales y pelágicos [39]. Además, se ha investigado la adherencia de MPs en tejidos suaves de las almejas, en donde se encontraron adherencias a órganos específicos como al tejido visceral, las quelas y el aductor. Estos contribuían al 50% del MPs en las almejas [40]. Finalmente, hay estudios enfocados en los efectos adversos de los MPs en especies marinas. Según un estudio realizado con la almeja azul *Mytilus edulis*, después de un periodo de exposición, bajo condiciones de laboratorio, han determinado que los MPs más pequeños tienden a acumularse más en los tejidos musculares y que pueden transferirse del intestino hacia el sistema circulatorio [38].

Un grupo de investigadores, en el 2018, realizaron una revisión de la literatura referente a estudios de MPs en biota alrededor del mundo de artículos publicados desde el 2013 y contabilizaron 28 artículos [41]. En el cuadro 3.2 se muestran algunos de los resultados seleccionados de este estudio y otros encontrados referentes a investigaciones realizadas en especies de interés comercial [42].



**Cuadro 3.2** Estudios recientes de la contaminación de MPs en biota [41], [42]

Ubicación, año y referencia	Microorganismo y zona de acumulación	Concentración y tamaño de los MPs	Color, composición y tipo, de MPs
Costa mediterránea occidental, España, 2013 [43]	Peces pelágicos <i>S. pilchardus</i> y <i>E. encrasicolus</i>	Frecuencia de ocurrencia de (14.28–15.24) %	Color: azul (45.8%), transparente (20.8%) y el color menos común fue el rosa (4.2%) Composición: 83% fibras Tipos: celofán, PA, PET, PE, poliacrilamida
Canal de la Mancha, 2015 [29]	Peces pelágicos y demersales	(1.90±0.10) piezas/pez El tamaño entre (0.13-14.3) mm siendo el más común de 1.0–2.0 mm Frecuencia de ocurrencia: 36.5%	Negro fue el color predominante en un 45.4% Composición: 68.3% fibras ,16.1% fragmentos, 11.5% cuentas Tipos: PE (35.6%) y seda artificial (57.8%)
Costa del Mediterráneo y costa Atlántica de España, 2016 [27]	3 especies de peces demersales: <i>Scyliorhinus canicula</i> , <i>Merluccius merluccius</i> y <i>Mullus barbatus</i>	(1.56±0.5) piezas/pez Rango entre 0.38-3.1 mm Frecuencia de ocurrencia 18.2%	Color predominante negro (51% de los MPs) Composición predominante fibras (71%)
Mar Mediterráneo en aguas del territorio de Turquía, 2016 [28]	Sistema digestivo de 28 especies de 14 familias de peces pelágicos y demersales	2.36 piezas/pez Frecuencia de ocurrencia del 58%	Color predominante: azul Composición: fibras (70%) y plástico duro (20.8%)
Islas que pertenecen al Pacífico Sur, 2017 [44]	Sistema digestivo de 34 peces comerciales	(2.4 ± 0.2) piezas/pez Frecuencia de ocurrencia de (24.3 ± 1.4) %	Color: 22% negro, 18% azul, 17% blanco y un 12% sin color Composición: 49% fragmentos, 33% fibras y 18% filamentos Tipos identificados de una submuestra: PS (28%), PET (26%), rayón (17%), PP (9%), PVC (7%) otros (12%), como poliamidas (4%), poliuretano (3%), acrílico (3%), goma (2%) y copolímero de estireno acronitrilo (< 1%)
Mar Jónico (Mediterráneo oriental), 2018 [45]	Peces de aguas profundas <i>P. violacea</i> , <i>G. melastomu</i> , <i>S. blainville</i> , <i>E. spinax</i> y <i>P. bogaraveo</i>	1.3 piezas/pez Tamaño varía de 5 a 60 mm	Color: azul, café, negro, transparente y verde Composición: 56% fragmentos, 22% fragmentos de bolsas plásticas, 19% materiales relacionados con el arte de pesca y un 3% fibras textiles
Costa del Golfo de Texas, 2018 [46]	6 especies bentívoros: Pez rey del sur ( <i>Menticirrhus americanus</i> ), corvina atlántica ( <i>Micropogonias undulantes</i> ) Pez espada del Atlántico ( <i>Chaetodipterus faber</i> ), trucha de arena ( <i>Cynoscion arenarius</i> ), pez aguja	1.93 piezas/pez Frecuencia de ocurrencia: 42.4%	Color: púrpura/azul (35.5%) y púrpura (23.0%), valor 3 (19.5%) y 4 (19.2%), y chroma 2 (27.4%) y 4 (23.9%) Composición: 86.4% fibras, 12.9% fragmentos

Ubicación, año y referencia	Microorganismo y zona de acumulación	Concentración y tamaño de los MPs	Color, composición y tipo, de MPs
	( <i>Lagodon rhomboids</i> ) y gruñido ( <i>Orthopristis chrysoptera</i> )		
Costa del Sureste del Océano Pacífico, 2018 [47]	Sistema digestivo de 7 especies de 4 familias (Atherinopsidae, Clupeidae, Engraulidae y Scombridae)	Frecuencia de ocurrencia de 2.1%	Composición: fragmentos y fibras de varios colores Tipos: PE (3 partículas) y PP (2 fibras)
Océanos Nórdicos y Bálticos, 2018 [48]	Sistema digestivo de especies demersales (bacalao, lenguado y platija) y pelágicas (arenque y caballa)	Frecuencia de ocurrencia 5.5%	Colores: blanco, transparente, negro y azul. Composición: 50% fragmentos Tipos: PE (aprox. 40%), PA (22%), PP (aprox. 13%), PS (2 piezas), PET/PEST/PU/Goma (1 pieza)
Aguas costeras de Polonia y del Estuario Tagus en Portugal, 2018 [49]	Crustáceo <i>Eriocheir sinensis</i>	Frecuencia de ocurrencia 13%	Color predominante: transparente Composición: fibras, partículas y fragmentos (identificados como artículos de pesca)
El Musa (estuarios del norte del Golfo Pérsico), 2018 [39]	Peces demersales y pelágicos ( <i>Platycephalus indicus</i> , <i>Saurida tumbil</i> , <i>Sillago sihama</i> , <i>Cynoglossus abbreviatus</i> )	20 piezas/individuo	Color: 71% negro/gris, 12% azules y verdes, 7% transparentes y 8% rojos-rosadas y 1.3% amarillas-anaranjadas
	Langostino tigre ( <i>Penaeus semisulcatus</i> )	8 piezas/individuo	Composición: fibras de un rango entre (< 100 µm y > 1000 µm)
Norte y Oeste de Escocia, 2018 [50]	Langostino ( <i>Nephrops norvegicus</i> )	Frecuencia de ocurrencia: 67%	Composición predominante: fibras Tipos: Nylon (37.2%), PP (29.8%), PET y PVC
Estuario del Mondego, Portugal, 2020 [51]	Lubina ( <i>Dicentrarchus labrax</i> ), dorada ( <i>Diplodus vulgaris</i> ) y la platija ( <i>Platichthys flesus</i> )	(1.67±0.27) (SD) Frecuencia de ocurrencia general: 38%	Color: azules (47%), transparentes (30%) y negro (11%), otros colores como rojo, amarillo y verde fueron menos frecuentes Composición: 96% fibras, 4% fragmentos Tipos: poliéster (31%), polipropileno (14%), poliacrilonitrilo (14%), polietileno (6%), poliamida 6 - nylon (5%) y 30% de las partículas analizadas fueron asignados como rayón, una fibra de celulosa semisintética

### 3.3 ANTECEDENTES SOBRE MICROPLÁSTICOS EN COSTA RICA

La información relacionada a MPs en Costa Rica es limitada. Se han realizado estudios aislados, donde distintos grupos de investigación han enfocado sus esfuerzos en la generación de datos en los diferentes compartimentos del ecosistema. A continuación, se muestran los resultados de los trabajos realizados anteriormente y las proyecciones del país.

- ✓ Estudio sobre la cuantificación de micropartículas de plástico en el océano fuera de la costa oeste de Costa Rica. Tesis de Frida Roos Lundström y Anna Mårtensson para optar por el grado de Licenciatura en Estrategia Ambiental [52]. Reportan un promedio de 9.91 partículas de MP/km<sup>2</sup>, este promedio es menor al informado por otros autores. Sin embargo, se demuestra la presencia de MPs en el agua que rodea zonas protegidas y comunidades con baja densidad poblacional. Lo cual revela que los ríos son una fuente clara de contaminación y que la presencia de MPs en los sistemas acuáticos debe ser prevenida.
- ✓ Por parte de la Universidad Nacional, estudiantes de la Escuela de Biología han realizado prácticas profesionales en la determinación de MPs en especies marinas.

En el 2018, se realizó el primer estudio para determinar la presencia de MPs en el sistema digestivo y tejido muscular de especies marinas dentro y fuera del Parque Nacional Marino las Baulas. En este estudio se encontraron 347 partículas en 33 organismos distribuidos en 16 especies de peces diferentes, donde las especies capturadas presentaban una alimentación carnívora. Se reportó un promedio de 185 partículas/organismo dentro del parque y un promedio de 162 partículas/organismo fuera del parque [53].

En el mismo año, se logró determinar la presencia de MPs en el estómago y musculatura de la jaiba *Callinectes arcuatus* en el Pacífico Norte de Costa Rica [54].

- ✓ A inicios del 2019, estudiantes de la Escuela de Biología de la Universidad de Costa Rica (UCR) identificaron 1101 piezas de plástico en 30 peces de la especie *Opisthonema libertate*, conocida como sardina gallera, que se usa tanto para el consumo humano, como para carnada de otros peces. La muestra fue recolectada en las cercanías del puerto de Caldera, en la provincia de Puntarenas. De la totalidad de piezas encontradas, 875 fueron fibras y 226 partículas. En promedio se identificaron 29 fibras y 8 partículas por individuo [7].
- ✓ En octubre del 2019, la UCR inicia un primer estudio en las playas de las costas del Pacífico y del Caribe con el objetivo de crear una línea de investigación. Se han identificado MPs en Jacó, Esterillos, Puntarenas y Punta Morales, en el Pacífico y en Manzanillo, Cocles, Puerto Viejo, Cieneguita, Playa Bonita y Westfalia, en el Caribe.

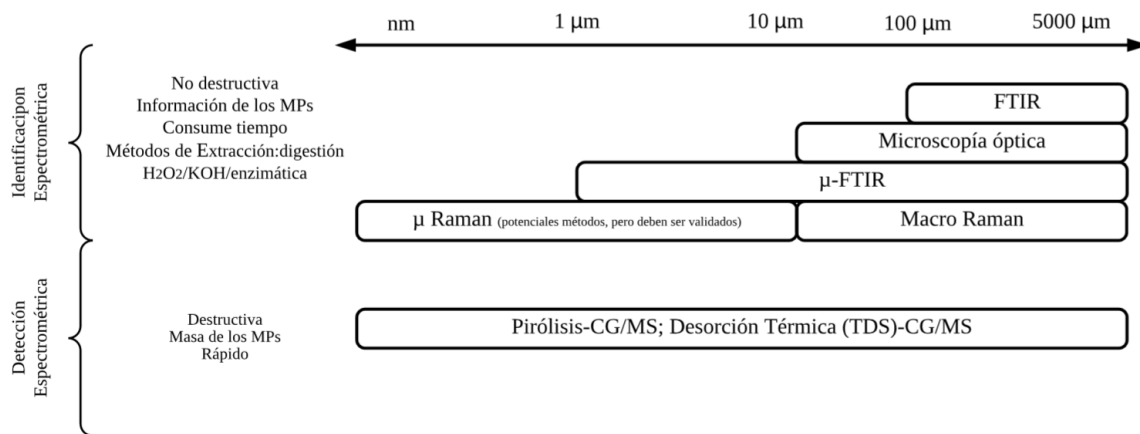
Entre los materiales que más se identificaron, el polietileno y poliestireno (68%) son los principales [8].

- ✓ En el 2020 se aprueba un proyecto FEES que involucra un grupo de investigación multidisciplinario de la UNA, el ITCR y la UCR. Este propone determinar MPs en los sectores pesqueros del golfo de Nicoya y Golfo Dulce, para su posterior comparación. Esta investigación es parte de ese estudio mayor, y establecerá la metodología a seguir para lograr los objetivos en dos años.

### 3.4 MÉTODOS REPORTADOS EN LA LITERATURA PARA DETERMINAR MICROPLÁSTICOS

#### 3.4.1 Métodos para determinar microplásticos en biota

A pesar del progreso en los últimos años, los métodos para determinar MPs en la biota difieren significativamente y no hay una metodología consensuada que permita la comparación entre diferentes estudios. Hay múltiples técnicas propuestas para la extracción y/o cuantificación de MPs en biota [55]. En la Figura 3.1 se pueden observar los diferentes métodos categorizados de acuerdo si el método es o no destructivo.



**Figura 3.1** Metodologías disponibles para determinar MPs [55]

Las categorías que se observan en la figura 3.1 constan de dos fases: la extracción con su subsecuente identificación. En la primera categoría se describen los protocolos no destructivos que permiten una caracterización detallada de los MPs, incluyendo tamaño, forma y color. La tipología del polímero es analizada con diferentes técnicas espectrofotométricas, desde micro Espectroscopía Infrarroja por Transformada de Fourier (μFTIR) hasta micro Espectroscopía Raman (μRAMAN). Estos métodos tienen la característica que demandan mucho tiempo. Los métodos químicos permiten adquirir datos



más rápidamente, pero son destructivos. A pesar de que proveen la masa del polímero (peso), no brindan información sobre las características más importantes de estos tales como el color, tamaño y forma [55].

La categoría escogida dependerá del propósito u objetivo de la investigación. A nivel biológico, el tamaño y forma de la partícula son muy importantes al analizar la ingesta de los MPs y los posibles efectos adversos. Debido a esto, los métodos basados en la extracción y la caracterización espectrofotométrica de los MPs son más generalizados y preferidos. Es importante indicar que sin importar el protocolo seleccionado, prevalece la preocupación de que los resultados realmente representan la contaminación de MPs en el ambiente [55].

### **3.4.2 Muestreo**

Se ha reportado la ingesta de MPs por varios vertebrados e invertebrados marinos bajo condiciones de laboratorio y en campo [56]. Los estudios de ingesta de MPs en organismos marinos usan generalmente camas de plásticos de polímeros conocidos, que pueden ser fácilmente reconocidos y cuantificados bajo el microscopio observando el contenido del intestino y las excreciones del organismo [57]. En estos casos, el uso de partículas fluorescentes facilita la recuperación y la enumeración de las partículas.

Investigaciones en la ingesta de MPs por organismos vertebrados en campo requieren un esfuerzo mucho mayor ya que hay pocos estudios en esta área [58]. Por lo que los estudios de MPs en organismos vivos son mayoritariamente en peces. El objetivo del muestreo es determinar el contenido del sistema digestivo o las excreciones de un organismo. Los organismos muestreados directamente en búsqueda de MPs (generalmente peces), son capturados usualmente por trampas o red de pesca. Después de la disección, el contenido intestinal o el sistema digestivo debe ser congelado o conservado para su posterior análisis. Las muestras biológicas pueden ser conservadas utilizando fijadores libres de plásticos (ej. formalina) o pueden ser congeladas, secadas y guardadas en oscuridad hasta su análisis [59].

### **3.4.3 Extracción de los microplásticos**

La digestión del tejido de las muestras biológicas es un paso crucial para la eliminación de la materia orgánica y la posterior identificación química de los polímeros [55]. En el laboratorio los organismos deben ser medidos y pesados previamente antes de la extracción de los tejidos de interés. En el caso de la biota, el sistema digestivo completo del pez, o todo el organismo en invertebrados pequeños (ej. Bivalvos y gusanos) deben ser examinados. En el Cuadro 3.3 se presentan los métodos de extracción más utilizados y la descripción de los resultados obtenidos.

**Cuadro 3.3** Enfoques de extracción más reportados [55]

<b>Método de Extracción</b>	<b>Descripción de sus resultados</b>
Ninguna	Únicamente mediante observación, altamente subjetiva y variable
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> 30%	Degradación parcial de las partículas (cambios en el tamaño y forma)
Digestión ácida	Degradación/digestión de varios polímeros
Peróxido de hidrógeno H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> 15%	Apropiada para todas las muestras. Alto consumo de tiempo
Hidróxido de potasio KOH 10%	Enfoque rápido. No apropiado para muestras con alto contenido de grasas
Digestión enzimática	Apropiado para muestras pequeñas. No apropiado para tejidos grandes ya que es costoso.

El análisis utilizando un tratamiento alcalino con hidróxido de potasio (KOH) al 10% hasta que la digestión completa ocurra ha sido reportado como el más adecuado [36], [51], [60][36][35]. Sin embargo, se menciona que este enfoque no es apropiado para muestras con una cantidad considerable de grasa, ya que la digestión puede durar varios días y dañar parcialmente ciertos polímeros [36]. La combinación de KOH al 10% con un detergente, como el hipoclorito de sodio, puede ser apropiado para muestras con grasas ya que acelera el proceso de degradación [55]. En un estudio se reportan resultados efectivos con una disolución 1:1 KOH:NaClO como tratamiento [61].

Los métodos enzimáticos proveen altas tasas de digestión sin daño a los polímeros, pero estos tratamientos son adecuados únicamente para muestras pequeñas a altos costos. Para algunas especies, la combinación de digestiones alcalinas y enzimáticas, algunas veces acopladas a un proceso oxidativo son necesarias para proveer una digestión satisfactoria (limpia). Estas combinaciones también pueden reducir el tiempo de digestión [55].

Temperaturas superiores a 60 °C deben ser evitadas ya que se ha demostrado que dañan ciertos tipos de polímeros [62]. Después de la digestión, la disolución remanente puede ser directamente filtrada o, si las partículas inorgánicas predominan pueden ser sujetas a una separación por densidad [55].

### **3.4.4 Identificación fisicoquímica de los microplásticos**

Se utilizado diversos enfoques para la identificación del tipo de MPs, desde la visualización por el ojo humano hasta el acople de múltiples equipos para cuantificar e identificar el tipo de polímero de que está compuesta la partícula [63]. En los Cuadro 3.4 y Cuadro 3.5 se describen los métodos de identificación más reportados en la literatura.

**Cuadro 3.4** Revisión de la literatura de los métodos/técnicas para identificar MPs

<b>Técnicas de Visualización: Examinación con microscopios ópticos</b>			
<b>Técnica</b>	<b>Descripción</b>	<b>Ventajas</b>	<b>Desventajas</b>
Inspección visual e inspección con un microscopio óptico	La visualización es importante para identificar MPs en mezclas de materiales y residuos, por ejemplo, fragmentos de concha, algas, arena y vidrio [20].	Permite identificar grandes MPs (1-5 mm) y evaluar su color, tamaño y transmisión de la luz. El microscopio óptico sirve para identificar partículas todavía más pequeñas y obtener imágenes para su análisis, lo cual provee la forma y número de partículas [31]	Partículas sin un color o forma de fácil identificación son un desafío para la selección visual. Se requiere de microscopía electrónica para obtener imágenes magnificadas que permitan identificar partículas con un aspecto ambiguo [63].
Microscopía electrónica de barrido acoplada a espectroscopia de energía dispersada SEM-EDS [64].	Usado para la caracterización de la morfología de materiales muy pequeños y determinar su composición elemental.	El SEM aporta imágenes de alta definición y ayuda a diferenciar partículas con aspecto a plástico, el EDS provee información elemental de las muestras al detectar los rayos X emitidos característicos de los elementos en la muestra por el haz de electrones lo cual brinda algunas herramientas para su posible identificación	No son análisis concluyentes. Requiere mucho tiempo de preparación de la muestra y tiempo de análisis (ej. Secado de la muestra, deposición, cobertura con carbón/oro/cobre), lo cual puede interferir con el análisis morfológico para MPs ultra pequeños.
Microscopía de Fluorescencia	Estos microscopios colectan la fluorescencia emitida de las muestras que son excitadas por las ondas de excitación con la selección apropiada de láseres [66].	Se ha utilizado para la cuantificación de MPs y se ha encontrado que un tinte fluorescente se puede utilizar para marcar las partículas plásticas y es muy utilizado para detectar MPs en tejidos u organismos [56].	Los polímeros usualmente muestran fluorescencia de fondo o auto fluorescencia cuando son irradiados con un rayo UV o luz visible. Además, los aditivos químicos en las formulaciones poliméricas también pueden afectar las propiedades fluorescentes [66].
<b>Mapeo y cuantificación fisicoquímica</b>			
Espectroscopia de Fluorescencia [68]	Se utiliza un lente objetivo para enfocar la luz de excitación en la muestra y recoge la emisión de fluorescencia. Brinda un mapeo físico y semi cuantitativo.	Permite la detección de MPs en una única línea de absorción y emisión con alta sensibilidad	Exige que las muestras sean auto fluorescentes o etiquetadas con tintes fluorescentes. Los pretratamientos típicos incluyen centrifugación y digestión por ácidos u oxidantes (p. ej., ácido clorhídrico e hidróxido de sodio) los cuales son necesarios para la purificación de MP en células microgliales.

**Cuadro 3.5** Revisión de la literaria de los métodos químicos para identificar MPs

<b>Identificación Química</b>			
<b>Técnica</b>	<b>Descripción</b>	<b>Ventajas</b>	<b>Desventajas</b>
Espectroscopía Infrarroja Transformada de Fourier (FTIR)	Se obtiene información química a través de la detección de los modos de vibración de las moléculas que componen la muestra a diferentes frecuencias infrarrojas en un amplio rango espectral. Los interferogramas colectados por el detector son transformados por Fourier en un espectro de absorbancia convencional contra número de onda, en los cuales la absorbancia característica o los picos de transmitancia corresponden a los enlaces químicos característicos o vibraciones moleculares [69]	Cuenta con 4 modos de análisis: transmisión, reflectancia difusa, reflectancia especular verdadera/adsorción de reflexión y la reflexión total atenuada [70]. Para obtener un espectro certero, la selección del modo se basa en las propiedades de la muestra. En años recientes se ha combinado esta técnica con un microscopio lo cual ha emergido como micro-FTIR, permitiendo la caracterización de partículas de tamaños de hasta 10 $\mu\text{m}$ [71]	Al aumentar el tiempo de adquisición o las corridas de recolección pueden aumentar la relación señal/ruido. Como es un análisis que se basa el contacto de la superficie, se puede comprometer la integridad de la muestra para partículas de MP muy pequeñas y frágiles [72]
Espectroscopía Raman	Utiliza el desplazamiento de frecuencia de la luz dispersa inelástica de la muestra basada en el efecto Raman para obtener los modos vibracionales e identificar especies químicas de las muestras [73].	Aunque puede caracterizar MPs, la espectroscopía Raman generalmente detecta MPs mayores que 10 $\mu\text{m}$ , mientras que la espectroscopía micro-Raman es capaz de detectar MP con mayor resolución de hasta 1 $\mu\text{m}$ [74]	La presencia de líquidos/agua/humedad no afectan negativamente la medición. Sin embargo, puede afectar la dispersión de la luz incidente e interferir en la detección, por lo tanto, la purificación de la muestra es esencial. Es susceptible a las interferencias por fluorescencia. Algunas muestras pueden degradarse por la potencia del láser y en ciertos casos pueden incurrir en degradación térmica.

Fu et al. (2020) reportan otros métodos/técnicas para identificar MPs, por ejemplo: análisis de citometría de flujo; dispersión dinámica de luz; imágenes hiperespectrales; microscopía de fuerza atómica (AFM) y técnicas híbridas de AFM como emergentes plataformas de caracterización; cromatografía de gases–espectrometría de masas; matriz de desorción láser/ionización asistida por espectrometría de masas de vuelo; y cromatografía líquida de alto rendimiento [63].

En los Cuadro 3.4 Cuadro 3.5 se describen las principales ventajas y desventajas de cada una de las técnicas empleadas en distintos estudios. Como se observa, existen grandes retos en la identificación fisicoquímica de las piezas aisladas. Estas limitantes se deben a las características físicas de los MPs, como sus pequeñas dimensiones, y a los procesos naturales que sufren y pueden afectar su composición química lo cual afecta las mediciones bajo estas técnicas. Otra limitante es la disponibilidad de estos equipos en los centros de investigación y el personal capacitado para este tipo de muestras. En Costa Rica se encuentran todos los equipos mencionados en estos cuadros, sin embargo, estos se ubican en diferentes instituciones y no hay personas especializadas en el análisis de este tipo de muestras.

Como se mencionó en secciones anteriores, se han investigado los MPs en diversas matrices ambientales y desde distintos enfoques. Un grupo de investigación en el CIIMAR-Universidad de Porto (Portugal) está trabajando activamente en los MPs y su impacto en los suelos agrícolas. De esta investigación han surgido diversos artículos en los que se plantea el uso de la técnica de histología en tejidos de gusanos para evidenciar el daño y las respuestas del sistema inmune a los MPs. En dichos ensayos se evidencia la afectación que sufren estos organismos debido a su exposición [75].

### 3.5 EFECTO DE LOS MICROPLÁSTICOS EN ZONAS DE CONSERVACIÓN

Se han realizado esfuerzos en determinar la presencia de MPs en zonas de conservación y/o protegidas. En un estudio realizado en una reserva marina alejada de la costa perteneciente a California, Estados Unidos, llamada Bodega, se determinó una concentración de partículas de MPs en el agua de mar de 36.95 plásticos/L y en sedimentos de  $0.227 \pm 0.135$  plásticos/g promedio. La densidad de MPs en la superficie de dos especies de microalgas morfológicamente distintas fueron en promedio  $2,34 \pm 2,19$  plásticos/g en *Pelvetiopsis limitata* y  $8.65 \pm 6.44$  plásticos/g en *Endocladia muricata*. Además, se determinó que la densidad más alta se encontró en el caracol herbívoro, *Tegula funebris*, con  $9.91 \pm 6.31$  plásticos/g, posiblemente debido a la bioacumulación [4].

Otro estudio realizado en el este del Área Especial de Conservación en Mingulay (un área marina protegida en el Mar de las Hébridas, en el oeste de Escocia) determinó que un total del 11% de la macrofauna bentónica del área de Arrecife Mingulay y el Arrecife Banana

había ingerido MPs [76]. Por último, un estudio realizado en el área alrededor del Área Marina protegida de la Isla Asinara en el “Santuario de Pelagos” (Área Especial Protegida de Importancia Mediterránea), confirma la distribución generalizada de MPs en el Mar Mediterráneo. Además, este concluye que la circulación y las corrientes transportan MPs lejos de sus fuentes, contaminando áreas protegidas y amenazando la biodiversidad de ecosistemas marinos [77].

#### *Zonas de Conservación y entes reguladores en Costa Rica*

De acuerdo con el Sistema Nacional de Áreas de Conservación (SINAC) [78], los parques nacionales son *las regiones destinadas para la protección y conservación de la flora y fauna diversa de gran importancia nacional, gran variedad de ecosistemas no afectados por la ocupación humana, en donde las diversas especies naturales geomorfológicas son de importancia científica. Además de poseer un paisaje natural de gran belleza, por cual se permite bajo vigilancia, el turismo general.*

El Parque Nacional Marino las Baulas (PNMB) protege manglares que se encuentran dentro de la Convención RAMSAR sobre los Humedales, los cuales son de gran relevancia como hábitat de aves acuáticas y áreas de reproducción de diferentes especies marinas y forestales. Su importancia desde el punto de vista de conservación y el atractivo turístico principal, radica en el anidamiento de tortugas baula en las playas de esta área protegida [79].

El Instituto Costarricense de Pesca y Acuicultura (INCOPECA) es la autoridad ejecutora de la Ley de Pesca en Costa Rica. Por ende, le corresponde establecer; conforme criterios técnicos, científicos, económicos y sociales; las medidas de regulación para garantizar el aprovechamiento sostenible de los recursos pesqueros. Según criterio técnico emitido por la Dirección General Técnica, se establecieron para peces, crustáceos y moluscos, las tallas legales de primera captura correspondiendo a la tallas de primera madurez sexual [80]. Este parámetro biométrico es la longitud total del organismo. Este criterio también es utilizado en otros países, como Colombia y México, en donde se establece que el consumo y la comercialización son recomendados o aceptados si la talla de los individuos supera la talla de madurez [81].

En el Cuadro 3.6 se describen las principales características de las especies de interés para este proyecto, las cuales fueron obtenidas del PNMB.

**Cuadro 3.6** Generalidades de las especies de interés comercial en estudio

Familia	Especie	Nombre común	Usos (INCOPESCA) [82]	Características	Talla MAD (cm)
Carangidae	<i>Caranx caninus</i>	Jurel Toro	Incluido en la lista de especies de interés pesquero y acuícola.	Carnívoro de peces óseos y crustáceos bentónicos (cangrejos/camarones) Costero a una profundidad (3-100 m) Pelágico [82 ].	70
Centropomidae	<i>Centropomus armatus</i>	Róbalo	Por lo general cuando se captura está asociado con la corvina. Su carne es firme, de color blanco rosado y de muy buena calidad. Es muy apetecido en los restaurantes locales [84].	Carnívoro de peces óseos y crustáceos bentónicos (cangrejos/camarones) Costero a una profundidad (0-28 m) Demersal [84 ].	30
	<i>Centropomus medius</i>			36.6	
	<i>Centropomus viridis</i>			62.9	
Elopidae	<i>Elops affinis</i>	Macabi	Incluido en la lista de especies de interés pesquero y acuícola.	Carnívoro, se alimenta de crustáceos móviles bentónicos (camarones/cangrejos) y peces óseos Pelágicos. Costero y se encuentra en la columna de agua (0-10m de profundidad)[85 ].	32.33 [86 ].
Lutjanidae	<i>Lutjanus Colorado</i>	Pargo	Se comercializa como pescado entero, en supermercados, pescaderías y ferias del agricultor. La mayoría del pargo mancha y pargo seda, se exporta como pescado entero y en algunos casos se exporta en filetes hacia los Estados Unidos [87 ].	Costero a una profundidad (0-90 m) Carnívoro, se alimenta de crustáceos móviles bentónicos (camarones/cangrejos) Asociado a arrecifes	56.8
	<i>Lutjanus novemfasciatus</i>			Costero a una profundidad (2-60 m) Carnívoro, se alimenta de crustáceos móviles bentónicos (camarones/cangrejos), peces óseos, pulpos/calamares Asociado a arrecifes [88 ].	70
Portunidae	<i>Callinectes arcuatus</i>	Jaiba (crustáceo)	Se comercializan enteras, incluyendo las quelas o tenazas, por lo general se venden congeladas en pescaderías, supermercados y en algunas ferias del agricultor [88]. Se utilizan principalmente en sopas y arroces como un exaltador de sabor. Incluido en la lista de especies de crustáceos de interés pesquero para el Océano Pacífico costarricense.	Vive sobre fondos fangosos o fango-arenosos en estuarios y sistemas lagunares costeros. Parte de los invertebrados marinos de importancia comercial en la costa Pacífica de Costa Rica [90].	9.4

Talla MAD: talla a la que el 50% de los individuos han alcanzado la madurez sexual. Obtenido de [81]

## 4 MATERIALES Y MÉTODOS

Para el desarrollo de este estudio se escogen 2 grupos de organismos por analizar, demersales y bentónicos. Como se menciona anteriormente, según el hábitat en donde se alimentan los organismos, así puede ser su disponibilidad de ingerir ciertos tipos de MPs [21]. Los organismos demersales habitan en aguas libres y no tocan el fondo marino, por ende, su exposición es a los MPs flotantes. Los organismos bentónicos habitan en el fondo marino, por lo que están más expuestos a los MPs más densos con capacidad de hundirse y que se encuentran en los sedimentos del fondo marino [20]. Además, se propone el análisis de especies carnívoras de alto nivel trófico. Esta característica se determina con el fin de analizar si estos organismos, de interés comercial según el INCOPESCA [88], tienen una mayor exposición a MPs debido a la cadena trófica.

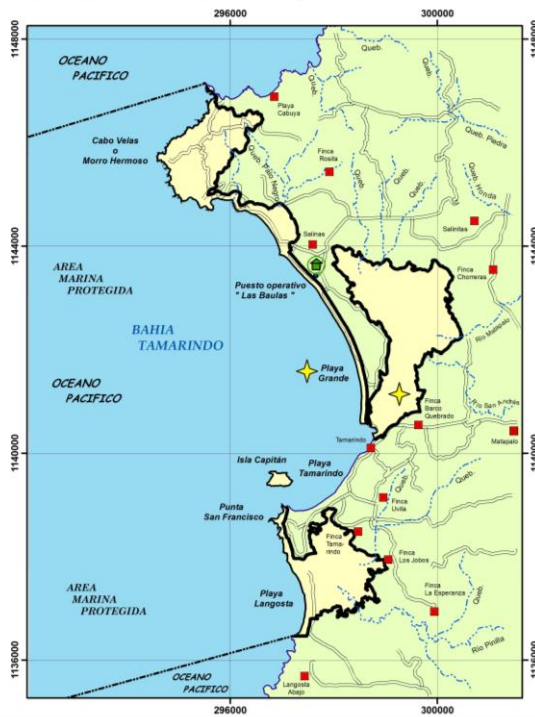
En el caso de los organismos bentónicos se escogen los crustáceos *Callinectes arcuatus* (jaibas). Debido a que se desconoce cuáles especies pelágicas predominan en el área de estudio, se escoge un arte (referido a la modalidad) de pesca artesanal, que seleccione peces que habiten en la columna con poca profundidad. Se plantea un tamaño de muestra de 30 crustáceos y 30 peces.

### 4.1 ÁREA DE ESTUDIO

Este estudio se realiza en el PNMB, creado en 1991, ubicado en la provincia de Guanacaste, cantón de Santa Cruz, en los distritos de Cabo Velas y 27 de abril, a 8 km de la comunidad de Matapalo y a 20 km de Tamarindo vía terrestre y 5 km vía estero. Comprende entre otras áreas geográficas los cerros Morro y El Hermoso; las playas Carbón, Ventanas, Grande y Langosta; los manglares San Francisco, Tamarindo y Ventanas [79]. Las muestras se recolectan en dos giras, en colaboración de los biólogos marinos Fausto Arias Zumbado y Jorge Valerio Vargas, en donde se obtienen 42 peces de 7 especies distintas *Centropomus viridis*, *Lutjanus colorado*, *Centropomus armatus*, *Caranx caninus*, *Centropomus medius*, *Lutjanus novemfasciatus*, *Elops affinis* y 38 crustáceos *Callinectes arcuatus*. El primer muestreo se realiza en mayo del 2019 por parte de un grupo de biólogos marinos de la UNA, se extraen 30 peces y 37 crustáceos. El segundo muestreo se realiza en enero del 2020 en la el cual se extraen 12 peces y un crustáceo. En la Figura 4.1 se muestra la ubicación del PNMB y los sectores en donde se recolectan los crustáceos (Playa Grande) y los peces (manglar).

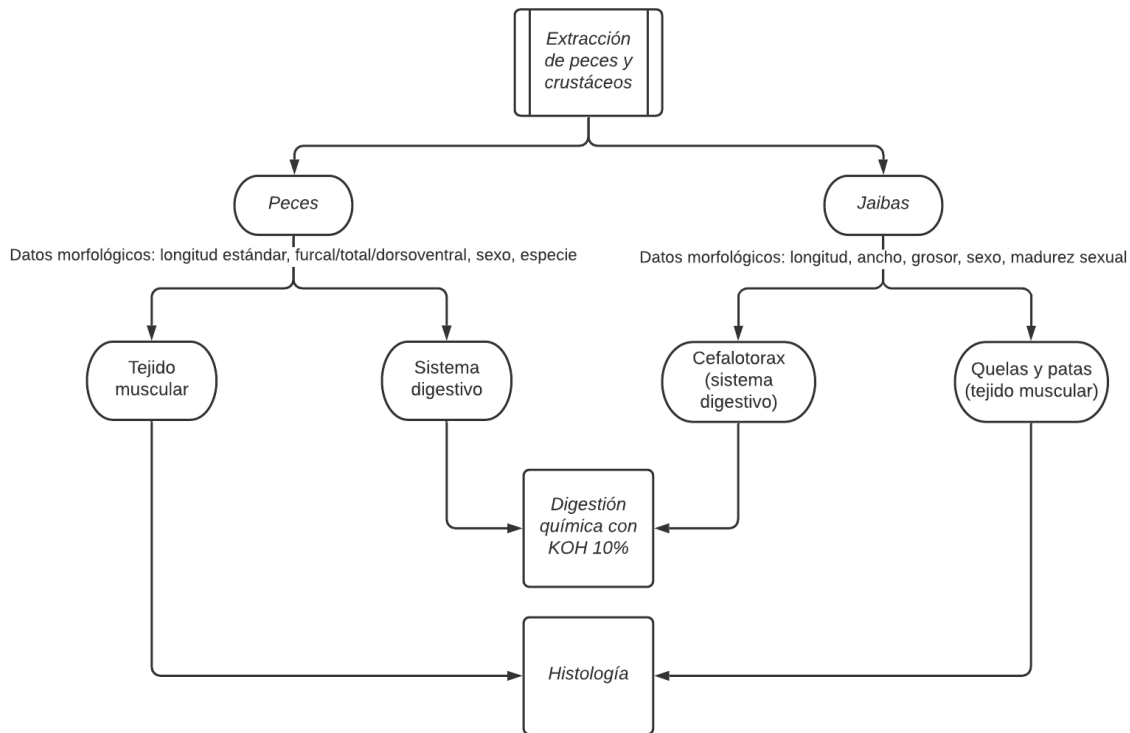


**PARQUE NACIONAL MARINO LAS BAULAS ---- 973 ha**  
**AREA MARINA PROTEGIDA ( 25168 ha )**



**Figura 4.1** Área de estudio con los límites del área protegida del PNMB. Estrellas amarillas marcan los sectores en donde se recolectan las muestras

En la Figura 4.2 se muestra un esquema de los organismos recolectados, los tejidos por analizar y la correspondiente técnica por utilizar.



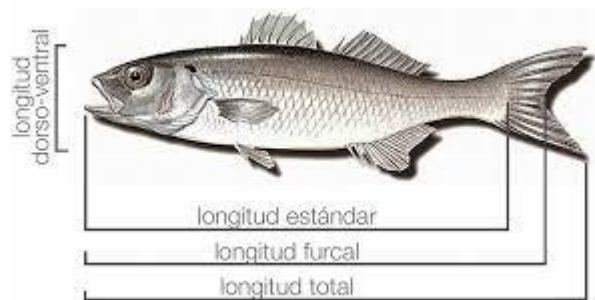
**Figura 4.2** Técnicas utilizadas según el tipo de tejido y organismo por analizar

#### **4.1.1 Extracción y preparación de los peces recolectados para su posterior análisis químico e histológico**

Los peces se capturan mediante el uso de carrete y señuelo con su posterior preservación en hieleras. Al finalizar el día de pesca, se acondiciona un área para procesar las muestras y tomar los datos morfológicos de las especies. El área se desinfecta con alcohol y el manejo de los peces se realiza con guantes de látex en todo momento. En la Figura A 1.1 del apéndice 1 se observa el acondicionamiento de esta área.

El procesamiento de los peces se realiza de la siguiente manera:

- a) Se identifica la especie, con ayuda de biólogos marinos.
- b) Mediante el uso de una balanza granataria se toma el peso.
- c) Con la cinta métrica y reglas de medición se toman las medidas morfológicas de longitud estándar, longitud furcal, longitud total y longitud dorsoventral, además, cada organismo fue enumerado y fotografiado (Figura 4.3 y Figura A 1.2 del apéndice 1).



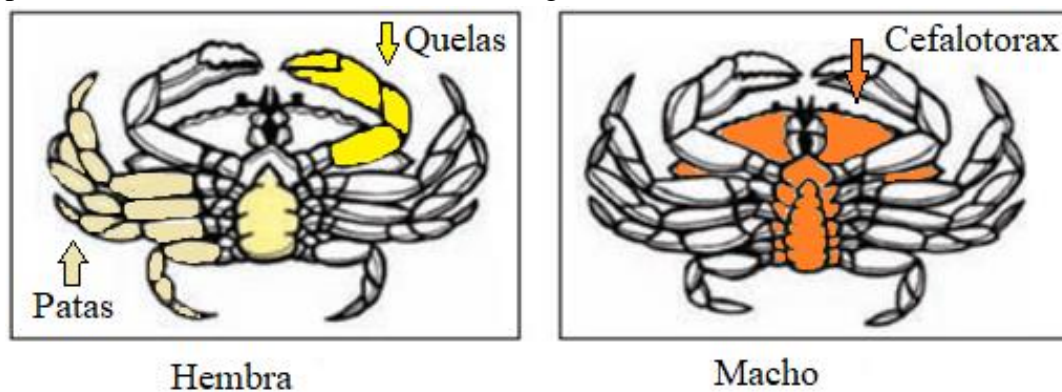
**Figura 4.3** Medidas morfológicas de un pez. Tomado de Tejado y López (2012) [91]

- d) Con el uso de un bisturí se abre la caja torácica, se determina el sexo y la madurez sexual.
- e) Se extrae el sistema digestivo; el cual incluye: estómago, intestino hígado, páncreas y ciegos pilóricos.
- f) Se coloca un envase hermético en la balanza granataria, se tara y se toma el peso del sistema digestivo. Seguidamente se llena el envase con formalina al 10%.
- g) Con un bisturí se toma una muestra del tejido muscular (aproximadamente 3x3 cm, grosor de 2 cm) ubicado en el músculo ubicado detrás del opérculo. Este se conserva en envases con formalina al 10%.

#### 4.1.2 Extracción y preparación de los crustáceos recolectados para su posterior análisis químico e histológico

Los crustáceos son recolectados manualmente a la orilla del mar durante los periodos de marea baja. Durante el muestreo se colocan en envases de vidrio y se transportan hasta el área de procesamiento al final del día.

- a) En el área de procesamiento se identifica para cada individuo el sexo y la presencia/ausencia de huevos en hembras grávidas.



**Figura 4.4** Método visual para determinar el sexo de cada jaiba

- a) Con un calibrador marca Venturi se toman las medidas de longitud, ancho y grosor.

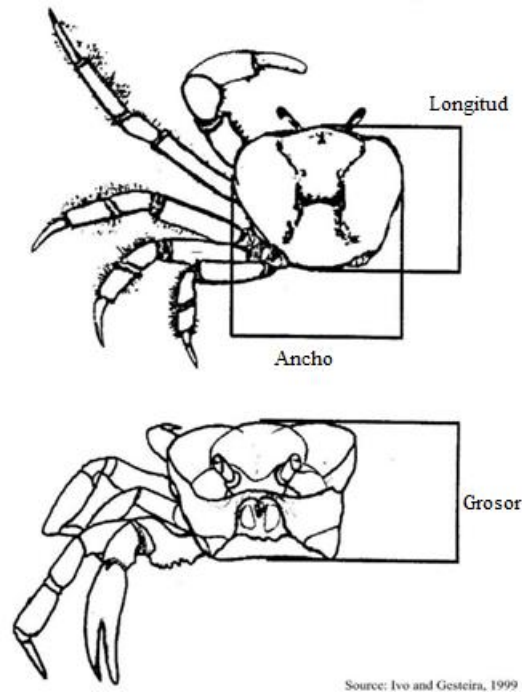


Figura 4.5 Medidas morfológicas de la jaiba

- b) Seguidamente, con el uso de pinzas, se separan las quelas y patas de cada individuo.
- c) En un envase hermético se toma el peso del cefalotórax y se embebe en formalina al 10%, para la posterior digestión química del sistema digestivo de la jaiba. Se realiza la digestión completa del cefalotórax debido a que no se puede extraer el sistema digestivo sin romper las estructuras.
- d) En otro envase se colocan las quelas y patas y se embeben en formalina al 10%, para determinar MPs en el tejido muscular mediante la técnica de histología.

#### 4.2 EXTRACCIÓN DE LOS MICROPLÁSTICOS DEL SISTEMA DIGESTIVO DE LOS PECES Y CEFALOTÓRAX DE LOS CRUSTÁCEOS

Debido a que la técnica de extracción de MPs en organismos vivos, es aún incipiente, a continuación, se presentan 2 metodologías aplicadas en las muestras de peces y crustáceos.

**Metodología A.** El primer grupo de peces recolectados el 15 y 16 de marzo del 2019 de la zona de estudio, corresponde a 30 peces y 37 crustáceos. Sin embargo, en los resultados se

reportan únicamente 15 peces y 27 crustáceos de este grupo de muestras, debido a errores en la manipulación en el procesamiento de laboratorio de las muestras restantes.

Para definir la metodología se realiza una revisión de literatura la cual incluye entre otros, artículos en temas de metodología para estudios en organismos acuáticos, salud humana, sedimentos, determinación de MPs, mamíferos y manuales de la Administración Nacional Oceánica y Atmosférica (NOAA) de Estados Unidos. Se procede a realizar una selección de aquellos que reportan estudios en el tema específico de procesamiento de muestras en biota y MP de los últimos 10 años. Adicionalmente, se contacta el Instituto de Portland, el cual ha realizado previamente investigaciones de este tipo, con el objetivo de obtener guía y consejo en la manera de procesar las muestras. Finalmente se revisan informes técnicos recientes en el tema de cuantificación de MPs en la costa Pacífica de Costa Rica. De la información recopilada se procede a tratar las muestras como se describe a continuación: [11], [55], [92]–[95]:

1. Digestión química de tejidos orgánicos: Se coloca el sistema digestivo de peces o cefalotórax, el cual contiene el contenido estomacal de los crustáceos, en un beaker adecuado para el tamaño de este y se le agrega una disolución de KOH al 10% hasta estar completamente cubierto. Se tapa con aluminio y se coloca en un agitador orbital a 300 RPM y 60 °C por 24 horas.
2. Trasvase: Una vez finalizada la digestión, el líquido es filtrado a través de un tamiz de acero con 60 micras de diámetro de poro, el cual es el de menor tamaño con que se cuenta durante la investigación. Es lavado cuantitativamente con agua destilada para asegurar su correcta filtración y el residuo retenido es transferido a una placa Petri previamente lavada e identificada para su uso.
3. Previsualización: Se colocan los residuos los residuos en la placa Petri y se observan bajo un estereoscopio con cámara, con el fin de documentar todas las posibles partículas de MPs, caracterizando su color, tamaño y forma.
4. Filtración: Mediante un embudo Buchner y un equipo de filtración al vacío, se filtra la muestra a través de un filtro de celulosa Whatman de 47 mm de diámetro y 5 micras de poro. Este filtro se coloca dentro de una placa Petri rotulada y se deja secar a temperatura ambiente.
5. Visualización: con el uso de un estereoscopio con cámara, se documentan todas las piezas encontradas que cumplen con los parámetros establecidos para la identificación de MPs descritos por la Guía de Identificación de Microplásticos del Marine and Environmental Research Institute [92].

Los resultados obtenidos al utilizar esta metodología no son los esperados debido a que el tiempo requerido para extraer los MPs fue superior al proyectado y el residuo obtenido de la digestión química no permite una búsqueda adecuada de los MPs. Lo anterior debido a que, en algunos casos, el residuo de la digestión era una gran cantidad de partículas de exoesqueleto provenientes del contenido estomacal del organismo. Se realiza una nueva revisión literaria enfocada en estos problemas en específico la cual incluye el análisis de protocolos validados extracción de MP en para biota, y artículos del mismo tema donde se analizan las dificultades encontradas y posibles soluciones. Los artículos revisados son del Marine Pollution Bulletin, Waste Management and Research, Science, Methods X y Marine Environmental Research; y se consultan solo artículos actuales del 2012 a la fecha. Las palabras clave usadas para la búsqueda son: protocol, standard, biota, microplastics y determination. Adicionalmente, se consulta con expertos relacionados en este tema para buscar posibles cambios que permitan mejorar el procesamiento de las muestras. A partir de esto, se seleccionan algunas muestras al azar, y se realizan las siguientes técnicas para conocer si la técnica de extracción de MP mejora:

1. Separación por densidad con una disolución de cloruro de sodio (NaCl) saturada [95] en las muestras con alto contenido de residuos.
2. Digestión con una disolución KOH/NaClO (30%) [61].
3. Tratamiento con ácido acético al 4% y agitación leve durante 24 horas después de la digestión.

Se plantean modificaciones para el segundo grupo de muestras y se trabaja con la siguiente metodología.

**Metodología B.** El segundo grupo de peces recolectados el 20 de enero del 2020 de la zona de estudio, corresponde a 12 peces y 1 crustáceo. Se procedió a analizar los sistemas digestivos de la siguiente manera:

1. Digestión: KOH al 10% con agitación a 300 RPM y 60 °C.
2. Trasvase a placa Petri mediante tamiz de acero de 60 micras.
3. Secado al horno a 45 °C durante 30 horas. Una vez transferido el residuo de la digestión a la Placa Petri, se le coloca a la placa una cobertura de aluminio con orificios para evaporar el agua.
4. Visualización mediante estereoscopio con cámara. Se visualizan las placas Petri secas y se documentan las partículas encontradas.

5. Extracción de las partículas. Mediante el uso de un microscopio y pinzas de disección, se toman las partículas identificadas como MPs y se colocan en viales transparentes para su posterior identificación fisicoquímica.

#### 4.3 IDENTIFICACIÓN FISICOQUÍMICA DE LAS PARTÍCULAS EXTRAÍDAS DE LOS INDIVIDUOS ANALIZADOS

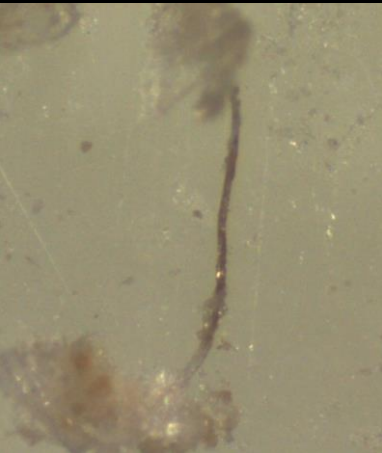
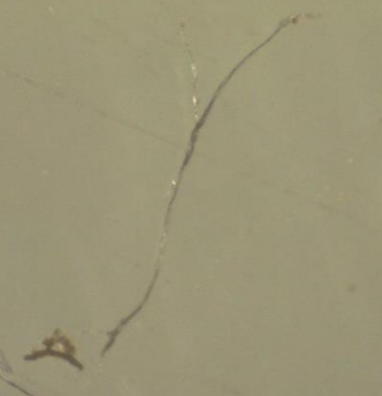

##### *Identificación física (color tamaño y forma) de los MPs*

Para la visualización y búsqueda de MPs al microscopio se toma en consideración los lineamientos planteados en el Guía de Identificación de Microplásticos del Marine and Environmental Research Institute [92]. En esta guía se introduce al usuario las características físicas esenciales para describir los MPs, el equipo necesario para su visualización y la manera correcta de leer un filtro o placa Petri. Se hace mención que al identificar MPs se deben pinchar las piezas para determinar su textura ya que mayoría de los MPs presentan una cierta flexibilidad y no se rompen. Además de que la mayoría de los MPs rebotan o brincan al ser pinchados. Si la pieza se rompe, no debe ser considerada como MP.

Otro método mencionado en la guía es la prueba con una aguja caliente, la cual puede ser utilizada en el caso de que no se logre distinguir entre piezas plásticas y materia orgánica. Se basa en que, en la presencia de una aguja muy caliente, las piezas plásticas se derriten o se deforman, mientras que materiales biológicos o no plásticos no lo hacen. Al realizar la prueba se debe asegurar que la aguja esté bien caliente [96]. Esta prueba es la única que no se realiza en esta investigación debido a que compromete la composición de las partículas, la cual es necesaria para las siguientes pruebas de confirmación e identificación.

Las características de los MPs están basadas en tres reglas establecidas por Hidalgo-Ruiz [20] y que han sido utilizadas por muchos en las investigaciones previas. A pesar de esto, hay excepciones a estas reglas. En la guía se hace uso de imágenes para explicar con mayor detalle cada una de ellas [55]. En el Cuadro 4.1 se muestran ejemplos de la aplicación de las reglas planteadas en la guía.

**Cuadro 4.1.** Reglas para la identificación de MPs

Reglas de Hidalgo-Ruiz	Excepciones a la regla consideradas en la guía	Ejemplos de la aplicación de las reglas y excepciones en la investigación
<p>1: No se deben observar estructuras celulares u orgánicas.</p>	<p>A pesar de que los MPs no tienen estructuras celulares u orgánicas, las bioincrustaciones pueden alterar la apariencia de las piezas plásticas y de esta forma, materia orgánica puede ser observada en la superficie del polímero. En este caso se debe tomar en cuenta si estas estructuras orgánicas están presentes en toda la pieza o si es en una sola porción o superficie.</p>	
<p>2: Las fibras deben tener un grosor uniforme a través de toda su longitud.</p>	<p>Sin embargo, en algunas se puede observar una deshiladura en los extremos de esta.</p>	
<p>3: Las partículas deben exhibir un color homogéneo.</p>	<p>Algunos plásticos no son homogéneos en color, algunas ocasiones se pueden observar patrones o rayas. Además, las bioincrustaciones pueden disfrazar el color, incluso las fibras pueden sufrir un blanqueamiento.</p>	

Estos lineamientos son la base para determinar cuáles partículas son extraídas para su posterior documentación y/o confirmación por otros métodos. Las mediciones se realizan con el software Image J con el fin de obtener la longitud promedio de las fibras y el perímetro de las partículas obtenidas. En el caso de las imágenes, su principal función es documentar el color y la forma. Sin embargo, se presentan grandes dificultades para documentar el color de muchas de las MPs identificados debido al contraste de las luces, la resolución y el papel filtro; los cuales hacen muy difícil poder obtener la imagen real y no bajo efectos visuales de



otra luz (como la UV). Se utiliza un foco de luz UV en la visualización ya que este permite identificar fibras o partículas de dimensiones muy pequeñas o que son de difícil visualización debido a los residuos de la digestión. En el caso donde se identifican MPs con este tipo de luz se coloca como “Indefinido” en el aspecto de color.

### *Identificación físicoquímica de los MPs*

Una vez extraídos los MPs de las muestras anteriores, estas partículas se procedieron a su identificación físicoquímica. Esta etapa de la investigación se realizó en coordinación entre el ITCR, UNA y el Centro de Alta Tecnología (CENAT) en su Laboratorio Nacional de Nanotecnología (LANOTEC). Debido a esto, se cuenta con disponibilidad de analizar las partículas mediante: FTIR, SEM/EDS, y Raman. A continuación, se describe el uso de cada técnica.

- ✓ FTIR. Los espectros FTIR son obtenidos con un equipo Nicolet iS50 FT-IR (Thermo Fischer Scientific), que se encuentra ubicado en el Laboratorio de Caracterización del LANOTEC. Las muestras son colocadas directamente en el equipo sin ningún tipo de tratamiento previo, se realiza un barrido de 500-4000  $\text{cm}^{-1}$ . Los resultados son analizados con el software OMNIC 8.1 (OMNIC Series 8.1.10, Thermo Fischer Scientific). De acuerdo con estudios [29], al interpretar los resultados de FTIR, solo se aceptan aquellas con un grado de confianza superior al 50% y aquellas que se consideren que tienen comparaciones de espectros confiables después de su identificación visual. En total se realizan pruebas de 3 piezas de MPs obtenidas de sistemas digestivos de peces y cefalotórax de peces, sin embargo, solamente se obtiene el resultado de una muestra. La principal limitación de este procedimiento es el tamaño de las partículas y fibras extraídas, las cuales son muy pequeñas, lo cual impide que el equipo pueda enfocar el láser y realizar la medición.
- ✓ Espectroscopia Raman. Los datos son obtenidos utilizando un Raman DXR™ Thermo Scientific de tres láseres (532 nm, 633 nm y 780 nm) acoplado a un microscopio confocal de cuatro objetivos (10x, 20x, 50x y 100x). Debido a que se desconoce el tipo de material se trabaja con el láser de 532 nm y un rango amplio y con una media de 30 exposiciones y una baja intensidad de laser (0.5). Se realizan análisis de 8 piezas aisladas del cefalotórax de un crustáceo (código C38) y del sistema digestivo de dos peces de la especie *Lutjanus colorado* (códigos F26 y F35).
- ✓ SEM/EDS. La topografía y la composición elemental de 4 MP seleccionados se determinaron mediante SEM/EDS de alto vacío. Se utiliza un SEM: JSM-6390LV, Jeol. Con una aceleración de voltaje de 15kV, con electrones secundarios (SEI) y un tamaño

de sección de 50. Las imágenes son tomadas a diferentes magnificaciones. EDS: Inca x-sight, Oxford Instruments, modelo 7582-M. Window: ATW-2, resol at 5.9keV.

Se realiza un muestreo de los MPs más representativos para realizar esta técnica debido a su elevado costo (cada sesión tiene un valor aproximado de \$200 US), no es posible analizar la totalidad de la muestra. Además de que el recubrimiento con oro imposibilita la posterior identificación de la muestra con RAMAN, FTIR y otras técnicas ya que el oro queda impregnado en la muestra. Se analizan 4 piezas aisladas del sistema digestivo de un pez *Lutjanus colorado* (F23).

A pesar de que esta técnica no brinda un resultado concluyente sobre la naturaleza de la muestra analizada. Estas técnicas se realizan en conjunto ya que el SEM provee una imagen nítida que permite identificar visualmente estructuras celulares y la técnica EDS brinda el análisis de la composición elemental [39]. Ambos resultados permiten realizar el descarte de piezas que podrían confundirse con MPs.

En este estudio el proceso de la extracción de MPs en los tractos digestivos de los organismos, a pesar del proceso de la digestión química que pretendía eliminar cualquier residuo biológico, la quitina de los exoesqueletos presumiblemente de presas semi-digeridas en los estómagos de los organismos, no fueron degradadas en su totalidad. Por lo que este residuo de origen natural, pudiera confundirse con piezas de MPs, pero este producto biológico contiene en su mayor proporción nitrógeno [97]. Por otro lado, cabe la posibilidad de confundir minerales con MPs [92]. Los principales elementos que componen la mayor parte de los minerales son: aluminio, hierro, magnesio, silicio, potasio, sodio y calcio. Por lo tanto, para descartar la posibilidad de que la pieza analizada sea quitina (exoesqueleto) o un mineral y no un MPs, se descarta cualquier resultado mediante EDS que contenga alguno de estos elementos en gran proporción.

Los polímeros sintéticos en su mayoría están conformados por cadenas compuestas de carbono (C), hidrógeno (H<sub>2</sub>) y oxígeno (O<sub>2</sub>) [98], de tal manera que se espera que los análisis de EDS contengan únicamente estos elementos. Como la mayoría de las piezas extraídas son fibras se indagó acerca los polímeros sintéticos más comunes y utilizados en la industria textil. Se calculó el porcentaje másico de su composición elemental para poder asociar los resultados del EDS. En el Cuadro 4.2 se enlistan los polímeros y sus características relevantes para este estudio.

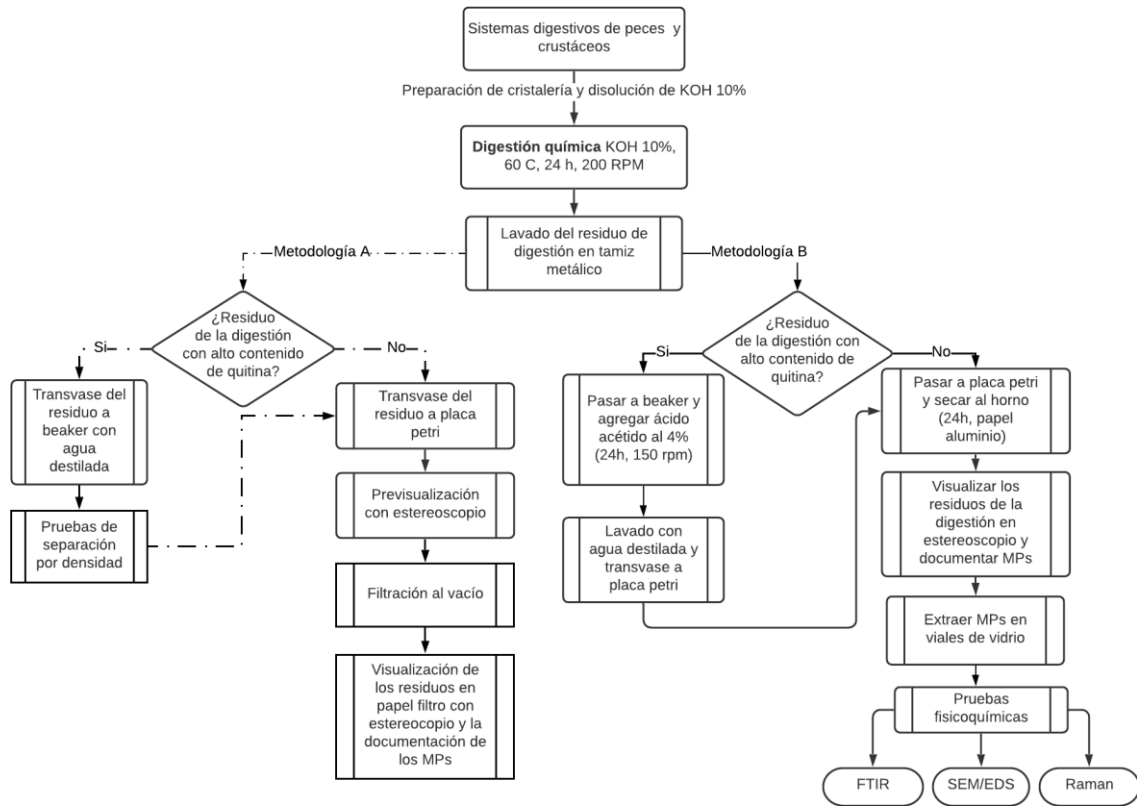
**Cuadro 4.2.** Polímeros sintéticos más comunes y utilizados en la industria textil [98]

Polímero	Uso comercial	Fórmula Molecular	Composición elemental (% en masa)
PE	Plástico más común, su principal uso es el embalaje.	$(C_2H_4)_n$	86 C
PP	Utilizado en el envasado y etiquetado. Es el principal polímero en materiales no tejidos.	$(C_3H_6)_n$	86 C
PVC	Tercer polímero más producido a nivel mundial. En su forma flexible (ftalatos) se utiliza en las tuberías, aislamiento de cables eléctricos, la piel artificial, pavimentos, y muchas aplicaciones donde reemplaza goma. Con algodón o lino, en la producción de tela.	$(C_2H_3Cl)_n$	39 C, 56 Cloro
PS	Es uno de los plásticos más utilizados. Los usos incluyen embalaje de protección los recipientes, tapas, botellas, bandejas, vasos, cubiertos desechables y en la fabricación de modelos.	$(C_8H_8)_n$	92 C
PET	Se utiliza en fibras para prendas de vestir, recipientes para líquidos y alimentos, termoformado para la fabricación, y en combinación con fibra de vidrio para resinas. La mayoría de la producción de PET es para fibras sintéticas (por encima de 60%).	$(C_{10}H_8O_4)_n$	62 C, 33 O <sub>2</sub>
Poliamida (nylon 6.6),	Se utiliza en fibras para textiles y alfombras y piezas moldeadas. Además del uso textil debido a su alta elasticidad y resistencia, se incluye: líneas de pesca, cuerdas de guitarra, cremalleras, tornillos, suturas quirúrgicas, pulseras de reloj (uso militar y de buceo).	$(C_{12}H_{22}N_2O_2)_n$	64 C, 12 N <sub>2</sub> , 14 O <sub>2</sub>
Poliacrilonitrilo (PAN)	Es un polímero versátil que se utiliza para producir gran variedad de productos incluyendo membranas de ultrafiltración, fibras huecas para la ósmosis inversa, fibras para textiles, fibras de PAN oxidadas.	$(C_3H_3N)$	68 C, 26 N <sub>2</sub> ,

En el análisis por EDS se toman mediciones de diversos puntos de una misma pieza analizada para reportar la composición elemental de cada muestra se realiza un promedio. Finalmente se hace una comparación entre la composición elemental teórica de los polímeros y el promedio calculado con los resultados obtenidos del EDS con el fin de identificar un posible rango de opciones sobre la procedencia de la pieza analizada. Cabe destacar que los polímeros sintéticos usualmente se encuentran junto con aditivos que se usan para modificar las características y propiedades de los polímeros según su uso, por ejemplo aportar mayor resistencia, mayor capacidad de absorción, entre otros [98]. Debido a esto, la composición

porcentual de los elementos varía y no es exacta a la que corresponde a un polímero sin aditivos.

En la Figura 4.6 se muestra un esquema donde se muestran las dos metodologías aplicadas según los cambios mencionados en la digestión química de los sistemas digestivos.



**Figura 4.6** Metodología aplicada para extraer e identificar MPs en el sistema digestivo de peces y jaibas

Finalmente se realizaron pruebas t de dos muestras para comparar si existían diferencias significativas entre la cantidad de MPs entre peces y jaibas. Para seleccionar la prueba que se ajuste a la distribución de los datos se realizaron pruebas de normalidad (Shapiro al 95% de confianza) y homocedasticidad (estadístico F al 95% de confianza). En ambas pruebas se determinó que los conjuntos de datos presentan normalidad y homocedasticidad, por lo que se procedió a usar la prueba paramétrica t de dos muestras. Además, se utilizó la prueba de comparación entre dos proporciones para determinar si hay una diferencia significativa entre el porcentaje de ocurrencia de ingesta de MPs en peces y jaibas.

#### 4.4 DETERMINACIÓN DE MICROPLÁSTICOS EN TEJIDO MUSCULAR DE CRUSTÁCEOS Y PECES MEDIANTE HISTOLOGÍA

La determinación de MPs mediante histología se realiza para poder determinar la presencia de MPs en tejido muscular. Para realizar esta técnica se cuenta con la colaboración del Laboratorio de Histología de la UNA y sus respectivas encargadas la bióloga marina M.Sc. Silvia Valverde Chavarría y la veterinaria M.Sc. Catalina Víquez Murillo. Las metodologías usadas en este apartado son proveídas por un grupo de investigadores que han realizado investigaciones utilizando la técnica de histología para determinar a nivel de laboratorio los efectos de los MPs en lombrices de tierra [99]. En dichos artículos se describen los pasos elementales para realizar este procedimiento y una escala de evaluación asociada a lo encontrado.

A continuación, se describe el procedimiento:

##### **4.4.1 Fijación de las muestras de tejidos musculares de peces y jaibas**

El propósito de utilizar un fijador es detener la vida de las células e impedir modificaciones post muerte que pueda sufrir la célula, de tal forma que se mantenga la estructura morfológica de las células y tejidos son que ocurran cambios notables en ellos [100].

Una vez finalizado el proceso de toma de datos morfológicos y disección del sistema digestivo de peces, usados en la metodología anterior, se procedió a la toma de las muestras de tejido muscular de los músculos laterales del pez. Estos tejidos musculares fueron preservados en formalina al 10% para su posterior procesamiento por medio de histología.

En el caso de los crustáceos, al finalizar el periodo de recolección y tomados los datos morfológicos; estos fueron preservados enteros en formalina al 10%, el cefalotórax fue usado en la metodología anterior. Se realiza la separación de las quelas y patas de cada individuo (observar Figura 4.4 Método visual para determinar el sexo de cada jaiba). Este proceso no resulto ser el apropiado para fijar las muestras de crustáceos, si bien la formalina es un excelente fijador de tejidos en peces, resulta que no penetra el exoesqueleto de los crustáceos y por ende no protege las células musculares de las quelas y patas del organismo del deterioro *post mortem*. En la sección de discusión se explica lo sucedido y la manera en que puede evitarse. Con el fin de minimizar el daño que la incorrecta fijación podría causar, las quelas y patas se colocan por 24 horas en el fijador Davidson (contiene principalmente: alcohol, formaldehído y ácido acético), y luego se colocan en alcohol al 70% [101].

#### 4.4.2 Preparación de las muestras

Mediante el uso de un equipo de bisturí y dentro de una cámara de extracción se realizan cortes a cada músculo de pez de aproximadamente 3x2 cm con un grosor de 0.5 cm. En el caso de los crustáceos (jaibas), se retira la quela y se extrae el tejido muscular con pinzas. Los tejidos se colocan en casetes plásticos especializados en histología y se mantienen todos en un frasco de vidrio con alcohol 70%.

#### 4.4.3 Inclusión en Parafina

Este proceso se realiza para que los tejidos musculares se infiltren con sustancias denominadas “de inclusión” con la finalidad de servirles de soporte. De tal forma que se forma un bloque homogéneo en dureza y consistencia entre el tejido y la sustancia de inclusión [100]. En este caso la sustancia de inclusión empleada es parafina, la cual es soluble en solventes orgánicos.

Se preparan 2 litros de las disoluciones de alcohol necesarias (Alcohol al 70-80-90-95%) y se utiliza la guía presentada en el Cuadro 4.3 Tiempos en las estaciones del procesador de tejidos con los tiempos especificados para procesar todas las muestras.

**Cuadro 4.3** Tiempos en las estaciones del procesador de tejidos

Estación	Reactivo	Tiempo (h)	Función
1	Etanol 70%	01:00	Deshidratación
2	Etanol 80%	01:00	
3	Etanol 90%	01:00	
4	Etanol 95%	01:00	
5	Etanol 100%	01:00	
6	Etanol 100%	01:00	
7	Etanol/Xilol 1:1	02:00	Diafanización
8	Xilol	02:00	
9	Xilol	02:00	
10	Parafina	01:30	Inclusión de parafina
11	Parafina	01:30	
12	Parafina	01:30	

#### **4.4.4 Formación del bloque de parafina**

Una vez finalizado el procesador de tejidos, se traspasan las muestras al sistema de consola de inclusión de tejido (HistoCore Arcadia H, marca Leica), el cual derrite la parafina y la mantiene caliente para formar los bloques. Las muestras se colocan en sets metálicos y se empujan hacia el fondo con la ayuda de una pinza con el fin de que la muestra esté lo mejor expuesta en la parte inicial del bloque. Se termina de rellenar con parafina y se coloca en la plantilla de frío para que este se solidifique.

#### **4.4.5 Microtoma (obtención de cortes histológicos)**

Para realizar estos cortes se utiliza un micrótopo y se establece un grosor de lámina de 4 micras. Se inicia el proceso realizando cortes gruesos (mediante el uso de la palanca) en uno de los extremos de la cuchilla con el fin de exponer el tejido de la manera más uniforme. Una vez expuesta toda la muestra, se comienzan a realizar los cortes de 4 micras. Las láminas de interés se colocan en un baño maría a 38 °C y una vez obtenidas varias láminas, se toma un portaobjetos previamente identificado y se colocan en este. Se realizan mínimo 3 láminas por muestra. Las láminas se colocan en cajas de vidrio y una vez finalizado el proceso de corte, se colocan en un horno a 38 °C durante 4 horas para derretir la parafina.

#### **4.4.6 Proceso de Coloración/Tinción**

El procedimiento de coloración/tinción consiste en que una estructura celular o tisular adquiere específicamente un color bajo la acción de una sustancia colorante. Proporcionar color a las estructuras permite distinguir entre ellas y facilita su visualización [100]. En este estudio se utiliza una coloración de hematoxilina-eosina ya que es la técnica de tinción más usada en el estudio de tejidos, a través del microscopio. Los núcleos se tiñen con hematoxilina y adquieren un color azul/morado mientras que el citoplasma y material extracelular se tiñen con la eosina y adquieren un color rosado.

##### *Preparación de la cámara de tinción*

La cámara de tinción es una serie de cajas de vidrio que contienen diferentes reactivos en donde se embeben los portaobjetos con las láminas previamente preparadas. Los reactivos por utilizar son: xilol, alcohol 100%-95%-70%, disolución de Kardasewitsh, disolución de alcohol-HCl, agua del grifo, hematoxilina y eosina.

Es importante destacar que los tintes (eosina y hematoxilina) se deben pasar a través de papel comercial de limpieza para evitar cualquier grumo o basura que interfiera en el proceso de tinción. Las cajas de vidrio que contiene cada una de las disoluciones a utilizar se deben limpiar previamente con jabón y agua destilada. Seguidamente se deben secar completamente

en el horno o a temperatura ambiente (boca abajo), esto es fundamental para añadir los reactivos ya que estos pueden reaccionar con la humedad y no actuar de manera adecuada. Además, cada caja y su respectiva tapa deben ser rotuladas correctamente rotuladas.

Las disoluciones se preparan de la siguiente manera:

- Disolución de Kardasewitsh (se almacena en una botella ámbar para evitar la reacción del amoniaco con la luz). En una botella ámbar se agregan 200 ml de alcohol al 70% medidos en probeta. En una cámara de extracción se añaden 50 ml de amoniaco al 25%.
- Alcohol-HCl. En una botella ámbar se agregan 198 ml de alcohol al 70% medidos con probeta. En una cámara de extracción se agregan a la botella 2 ml de ácido clorhídrico concentrado (medidos con una pipeta).

#### *Tinción y montaje del cubreobjetos*

Con un cronómetro se inicia el proceso de tinción descrito en el Cuadro 4.4. En cada estación se agita levemente la caja conteniendo los portaobjetos para asegurar una adecuada inmersión y distribución de los reactivos.

**Cuadro 4.4** Programación de la cámara de tinción

Número de Cubeta	Disolución	Tiempo	Función
1	Xilol		Desparafinar
2	Xilol		
3	Etanol 100%	2 minutos	Hidratar
4	Etanol 100%		
5	Etanol 95%		
6	Etanol 95%	1 minuto	
7	Etanol 70%	30 segundos	
8	Kardasewitsch	4 minutos	
9	H <sub>2</sub> O	6 minutos Bajo el chorro del agua*	
10	Hematoxilina	4 minutos	Colorear
11	H <sub>2</sub> O	5 minutos Bajo el chorro del agua*	Lavado
12	Alcohol-HCl	2/3 introducciones de aproximadamente 1 segundo	Diferenciar para eliminar el exceso de colorante
13	Eosina	2 minutos	Colorear
14	Etanol 95%	1 minuto	Deshidratar
15	Etanol 95%	30 segundos	



16	Etanol 95%	
17	Etanol 100%	
18	Etanol 100%	
19	Xilol	Diafanizar/Aclarar
20	Xilol	
21	Xilol	

Una vez finalizado el proceso de tinción se coloca el medio de montaje en cada portaobjetos para fijar sobre este un cubreobjetos y poder observar las láminas al microscopio.

#### **4.4.7 Observación de las láminas en el microscopio y análisis de resultados**

El proceso descrito anteriormente se realiza en las 29 quelas de los crustáceos y 28 tejidos musculares de peces, obteniendo un total de 171 láminas (por cada muestra se obtiene un promedio de 3 láminas por muestra de tejido). Sin embargo, al observar las láminas al microscopio se determina que las correspondientes al tejido muscular de los crustáceos no se pueden analizar debido a que el tejido está muy dañado ya que no se observan estructuras celulares definidas. Esto debido a la incorrecta fijación de las muestras en el paso inicial. Por esta razón solo se observan las láminas correspondientes a los tejidos musculares de los peces.

Para este análisis se utiliza un microscopio con cámara y el programa AmScope para documentar lo encontrado. Con el criterio de una especialista, la médica veterinaria M.Sc. Catalina Víquez Murillo, se observan las láminas en búsqueda de lesiones musculares, inflamación y objetos que no corresponden a la anatomía de un individuo sano. A todo lo encontrado se le toma una imagen para su posterior discusión y análisis.

En el caso de determinar una afectación que pueda ser asociada a MPs se plantea categorizarla de acuerdo a lo descrito por Rodríguez, *et al.*, 2017 [99]. Esta es una clasificación semi cuantitativa para cada lámina, en donde se evalúan afectaciones de inflamación, fibrosis y congestión. Todas entre un rango de G0 (daño mínimo/ausencia de daño) a G3 (daño severo y extenso).

## 5 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 5.1 ESTIMACIÓN DEL MICROPLÁSTICO PRESENTE EN LOS SISTEMAS DIGESTIVOS DE LAS ESPECIES MARINAS MUESTREADAS

En el Cuadro 5.1 se muestran los principales resultados obtenidos en los organismos analizados.

**Cuadro 5.1.** Resultados obtenidos del muestreo de MPs sistemas digestivos de peces y jaibas

Características	Peces	Jaibas
Cantidad de sistemas digestivos analizados	27	29
Longitud promedio de los individuos analizados	(35.3±10.5) cm	(50.8±9.3) mm
Rango de longitud de los individuos analizados	(19.8 - 72.3) cm	(36.6 - 85.7) mm
Cantidad de individuos con al menos 1 MP	24	22
Frecuencia de ocurrencia de MPs	89%	76%
Cantidad de MPs totales extraídos	90	58
MPs promedio por individuo	3.75±1.70	2.64±1.36
Cantidad de controles	3	4
Cantidad de MPs extraídos en controles	3	0

El procesamiento de las muestras se hace en grupos de 9 muestras debido a la capacidad del equipo, y cada conjunto, de muestras tiene asociado un control. En total se realizan 7 controles, para determinar si existen fuentes de contaminación de MPs en el laboratorio, 3 pertenecen a muestras de peces y 4 a muestras de crustáceos. Se determina la presencia de 3 MPs en el control asociado al último grupo de muestras de peces. De acuerdo con la metodología realizada, estos MPs se atribuyen a que el control es lo último en ser filtrado a través del tamiz metálico, y aunque este tamiz es lavado cuantitativamente cada vez que es utilizado es posible que sea una fuente de contaminación dentro del laboratorio. Por lo tanto, cabe la posibilidad de que, durante el proceso de trasvase de las muestras, piezas hayan quedado retenidas en el tamiz y fueran transferidas al control. También, existe la posibilidad de que los MPs en los controles provengan de MPs presentes en el aire dentro del laboratorio [92] o expedidas por la ropa de los laboratoristas, en el proceso de la manipulación de los controles, y que esta posible fuente puede ser prevenida con un sistema de flujo laminar que controle las partículas suspendidas en el aire [16]. En futuras investigaciones este paso del proceso debe ser realizado con mayor cuidado y rigurosidad. En la Figura A 1.7 del apéndice 1 se muestran las piezas identificadas en el último control asociado a los peces y las figuras A 1.8-1.18 corresponden a los MPs encontrados en los peces asociados a este control.

### *Cantidad de MPs por tipo de organismo*

Se determina la presencia de MPs en el sistema digestivo de los peces y en el cefalotórax de las jaibas. Un total 148 MPs son documentados, 90 en los peces y 58 en las jaibas. En peces se determina un promedio de  $3.75 \pm 1.70$  (SD) MP/pez y como se observa en el Cuadro 3.2, la mayoría de los estudios en biota marina reportan concentraciones menores por individuo. Por el contrario, pocos estudios reportan concentraciones superiores de MPs/individuo a la obtenida [39], [45]. Uno de los estudios mencionados analiza el pez de agua dulce *Lepomis* [45], en el otro estudio, el sitio de muestreo es una zona altamente contaminada y vulnerable a factores antropogénicos. Además, de que es el único estudio encontrado en donde; además de analizar el sistema digestivo, el intestino e hígado; se toman en cuenta órganos no involucrados directamente en procesos de ingesta como la piel y el músculo [39].

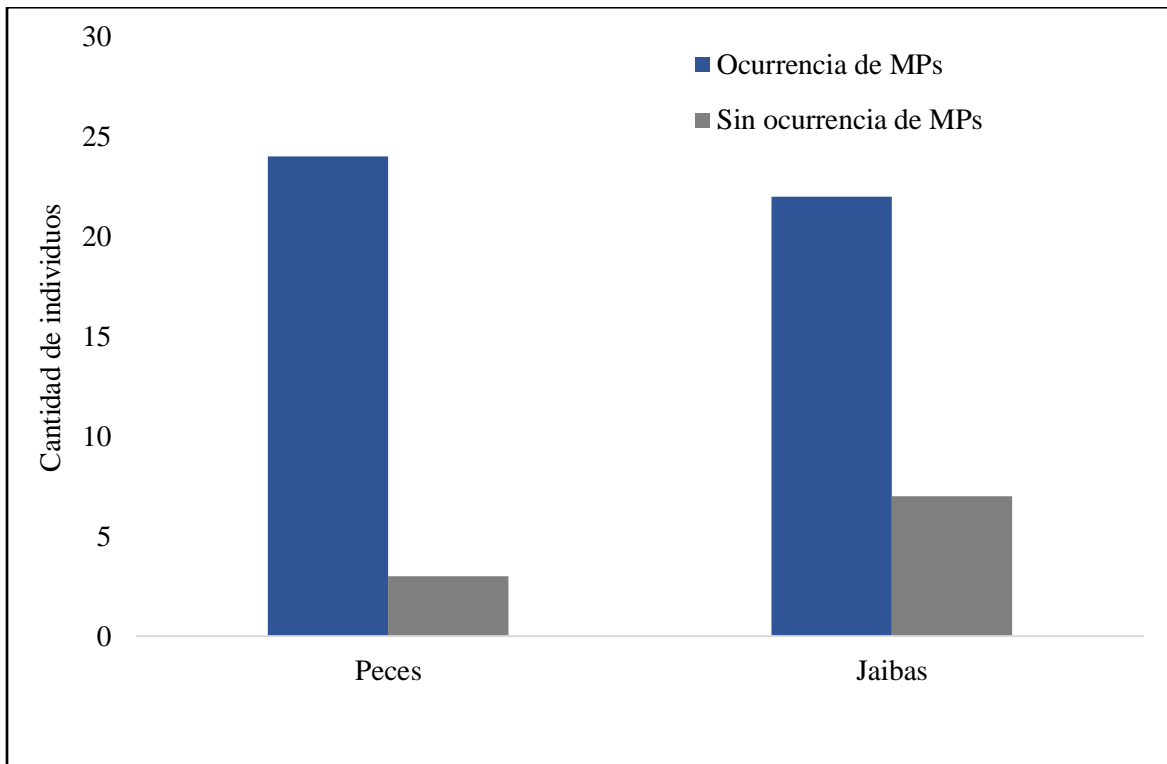
Referente a los crustáceos bentónicos costeros carnívoros (como la jaiba), se determina un promedio de  $2.64 \pm 1.36$  MPs/jaiba. En crustáceos se han realizado estudios en especies de langostinos y crustáceos decápodos. Sin embargo, debido al método de muestreo los resultados se reportan como MPs/gramos de tejido analizado [49], [50]. Por lo tanto, la información es limitada para realizar comparaciones.

La finalidad de analizar especies de peces demersales y crustáceos bentónicos es analizar si hay una diferencia en la ingesta de MPs dependiendo de su ambiente de consumo alimenticio. Se realiza una prueba paramétrica t de dos muestras para analizar si la media de los datos de MPs/pez es significativamente mayor a los MPs/jaiba. Se obtiene un valor p de 0.0004, por lo tanto, se asegura con un 95% de confianza que la cantidad de MPs/pez es significativamente mayor a la cantidad de MP/s jaiba, lo cual no concuerda con algunos estudios en donde se analizan especies pelágicas y demersales [24], [26], [41], [42]. Por el contrario, en dos estudios se reportan diferencias significativas en la cantidad de MPs y el hábitat de los organismos marinos. En uno se reporta que no hay diferencia significativa entre niveles tróficos pero que los peces pelágicos ingieren más que los demersales (27), y en el otro se reporta que las especies bentopelágicas analizadas en una región específica (Rapa Nui) presentan más MPs [18]. Esto lo atribuyen a que las especies pelágicas habitan en un área más amplia, por lo tanto, están más expuestos a ingerir mayor cantidad de MPs.

En la mayoría de los estudios se evidencia que los criterios al seleccionar las especies y las características de los organismos no permiten realizar análisis que aporten información sobre la ingesta de MPs de estos organismos y su relación con el hábitat, ontología, comportamiento, dieta, entre otras variables biológicas. Las principales diferencias de este estudio con los que analizan especies demersales y pelágicas son el método de captura y la zona de extracción. En la mayoría, las muestras se extraen utilizando trampas de arrastre en embarcaciones grandes, por lo tanto, las zonas de extracción se ubican a kilómetros de la

costa [24], [26], [41], [42]. En este estudio el método de captura de las muestras es mediante caña y señuelo artificial y la zona de extracción es dentro del manglar, por lo tanto, la cercanía a la costa es de metros. *Frecuencia de ocurrencia de MPs en los individuos analizados*

En la Figura 5.1 se muestra la cantidad de individuos analizados por tipo de organismo y la cantidad de individuos en los que se determinó al menos un MP (frecuencia de ocurrencia de MPs).



**Figura 5.1** Cantidad de individuos analizados y su frecuencia de ocurrencia de MPs obtenida en el sistema digestivo

Para discriminar la ocurrencia de MPs en diferentes especies o áreas geográficas, se ha establecido que la frecuencia de ocurrencia de MP es un mejor parámetro en comparación con el número de partículas ingeridas [55]. Para esta investigación, se determinan 90 MPs en 24 de los peces muestreados. Por lo tanto, 89% de los peces contiene al menos un MP en el sistema digestivo. En el caso de las jaibas, se extraen 58 MPs en 22 de los individuos analizados, lo cual corresponde a un 76% de ocurrencia. Los valores reportados en otros lugares del mundo varían desde 0.9% a 76.6% en el sistema digestivo de peces de mayor interés comercial [42]. En el caso de crustáceos se reportan concentraciones desde 13% [45] hasta 67% [47].

De acuerdo con lo mencionado, estos resultados determinan una cantidad significativamente mayor de MPs/ individuo en los peces demersales en comparación con los crustáceos bentónicos, aunque la frecuencia de ocurrencia de MPs en ambos tipos de organismos es similar. Debido a las diferencias entre especies, zonas muestreadas y métodos de captura, los valores obtenidos no son comparables con los valores reportados en otros estudios.

A pesar de que la zona de muestreo es un área en conservación, es esperado que se encuentren estos contaminantes en la biota. Esto por cuanto se ha demostrado la presencia de los plásticos en zona inhabitadas, como las regiones polares, en las profundidades del océano y montañas prístinas.

En el caso específico del PNMB, existen razones puntuales que podrían estar relacionadas con estos resultados. La primera es la actividad antropogénica cercana al al parque; ya que como se observa en la Figura 4.1, este se encuentra ubicado cerca de la localidad de Tamarindo. Este distrito es frecuentado por un volumen considerable de turistas y locales, lo cual provoca que el parque sea una zona vulnerable a los problemas asociados a las actividades desarrolladas en sus cercanías; como la gestión de los residuos sólidos, la descarga de aguas residuales y aguas grises, entre otros [102].

Otra de las posibles razones son las características de los manglares como ecosistemas. Estos son una zona de contacto entre las comunidades marinas y terrestres, ya que reciben diariamente una carga de agua del océano y otra de agua dulce que desemboca de ríos, arroyos terrestres o subterráneos, además de nutrientes y sedimentos [103]. Como se observa en la Figura 4.1, la entrada de agua dulce del PNMB es aportada por los afluentes de dos quebradas y de los ríos Matapalo y Andrés. Debido a su ubicación, la actividad antropogénica de Tamarindo no incide directamente en estos cuerpos de agua, pero rodea ciertos poblados con densidad poblacional baja. Además, el clima de la zona es tropical seco, por lo tanto, el caudal del agua dulce de estos ríos es bajo. Por estas razones, no se espera que el río sea la mayor fuente de contaminación del manglar. La principal entrada de agua al manglar del PNMB es la proveniente del océano y depende de las corrientes marinas influenciadas por la Contracorriente Ecuatorial del Norte (CCEN) [104].

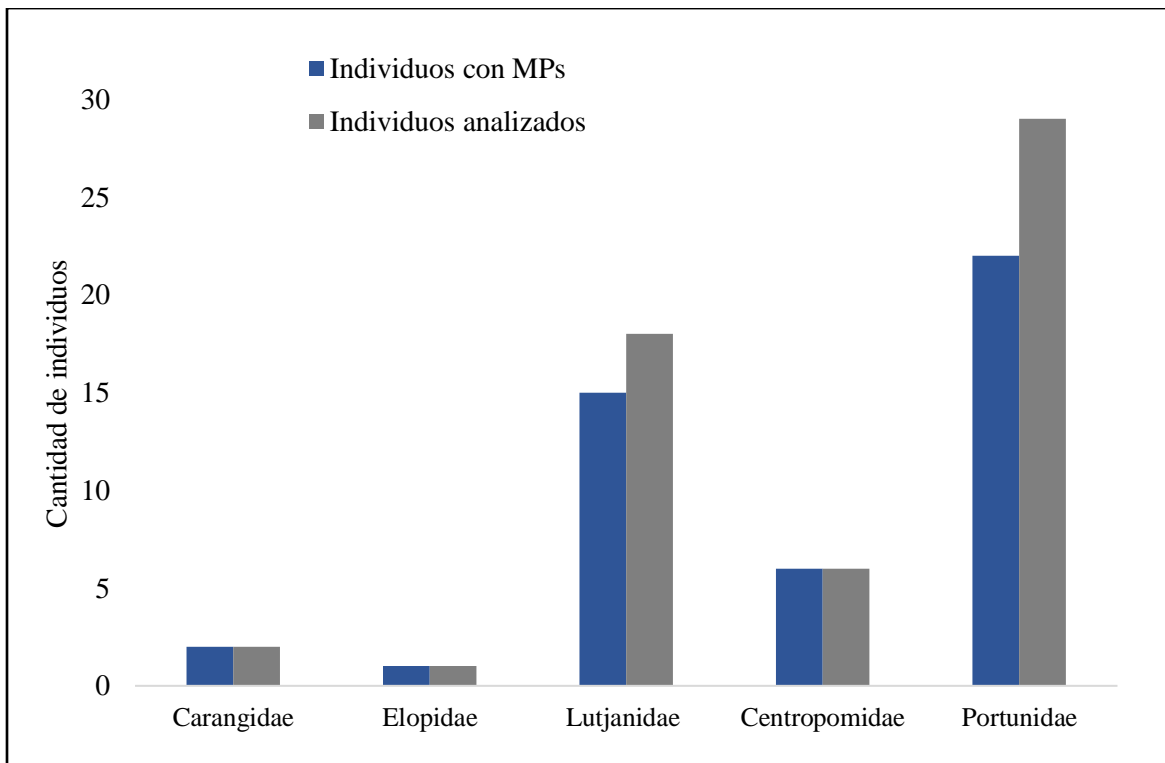
Las fuentes de MPs en los sistemas varían enormemente según la zona analizada [105]. En el medio acuático se ha determinado que la gestión de las aguas residuales de las plantas de tratamiento y los vertidos de estas, la contaminación urbana, las actividades industriales y las tormentas son las principales fuentes de escombros plásticos [106].

Según lo mencionado anteriormente, tomando en cuenta las características del manglar y su ubicación, se puede considerar que esta zona podría ser un reservorio del agua proveniente de estas corrientes marinas, y concentrar sus contaminantes. Lo cual reafirma que la

contaminación por plásticos es un problema global sin fronteras debido al transporte de larga distancia en los diferentes sistemas [105].

### *Especies marinas analizadas*

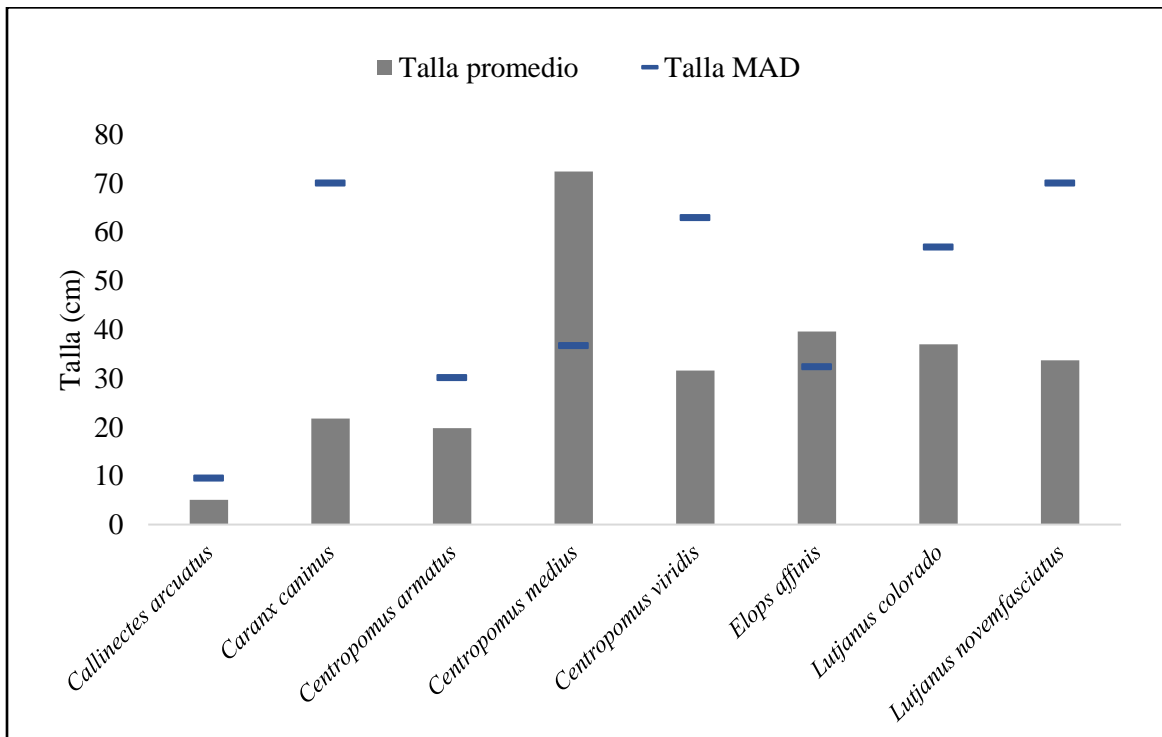
Como se ha mencionado anteriormente se analizan dos tipos de organismos, crustáceos y peces. Los crustáceos bentónicos carnívoros de la especie *Callinectes arcuatus*, conocidos como jaibas, pertenecen a la familia Portunidae. En el caso de los peces demersales carnívoros, los 27 individuos analizados pertenecen a 4 familias y 7 especies distintas que corresponden a *Caranx caninus*, *Centropomus armatus*, *Centropomus medius*, *Centropomus viridis*, *Elops affinis*, *Lutjanus colorado* y *Lutjanus novemfasciatus* (Cuadro 3.8). Esta diversidad de especies recolectada concuerda con lo determinado en el ámbito marino, ya que Costa Rica posee alta diversidad por metro cuadrado [107]. Debido a esto, durante el periodo de muestreo de los peces no se selecciona una especie en particular. En ambos muestreos se identifica que en esta zona del manglar predominan los peces *Lutjanidae*. En la Figura 5.2 se muestra la cantidad de individuos analizados por familia y su correspondiente cantidad de MPs extraídos.



**Figura 5.2.** Cantidad de organismos analizados según su familia y su ocurrencia de ingesta de MPs

Se obtiene una ocurrencia de 76% (22 jaibas) de los 29 individuos analizados de la familia Portunidae y todos de la especie *Callinectes arcuatus*. Un 66.7% de las muestras de peces (18 individuos) pertenecen a la familia Lutjanidae (pargos), en donde se obtiene un 83% (15 individuos) de ocurrencia de MPs. Para la familia Centropomidae (róbalos) se analizan 6 individuos (22% del total de las muestras de peces), y todos presentan ocurrencia de MPs. De las familias Carangidae (jureles) y Elopidae (Macabi), se analizan 2 y 1 individuos respectivamente, se determina MPs en todos los individuos analizados. Cabe resaltar que en todas las familias muestreadas se obtienen individuos con presencia de MPs.

A todos los individuos analizados se le toman medidas biométricas para analizar su relación con la distribución de MPs en los organismos. La longitud total de los peces y la longitud del cefalotórax de las jaibas son parámetros biométricos que contribuyen en la determinación del grado de madurez de los individuos. Aquellos que no han alcanzado su talla de primera madurez sexual son considerados juveniles y organismos por encima de este valor se consideran adultos [108]. Esto responde a la variación ontogénica de cada especie, en las fases tempranas de crecimiento la ingesta de los organismos incrementa en la frecuencia y disminuye su selectividad, en individuos adultos, la ingesta es más selectiva [109]. Para comprender la incidencia del MP en la ontogenia de los individuos analizados se realiza una comparación con la literatura sobre la talla de madurez sexual de cada especie con la talla promedio obtenida en este muestreo, en la Figura 5.3 se observa esta comparación.



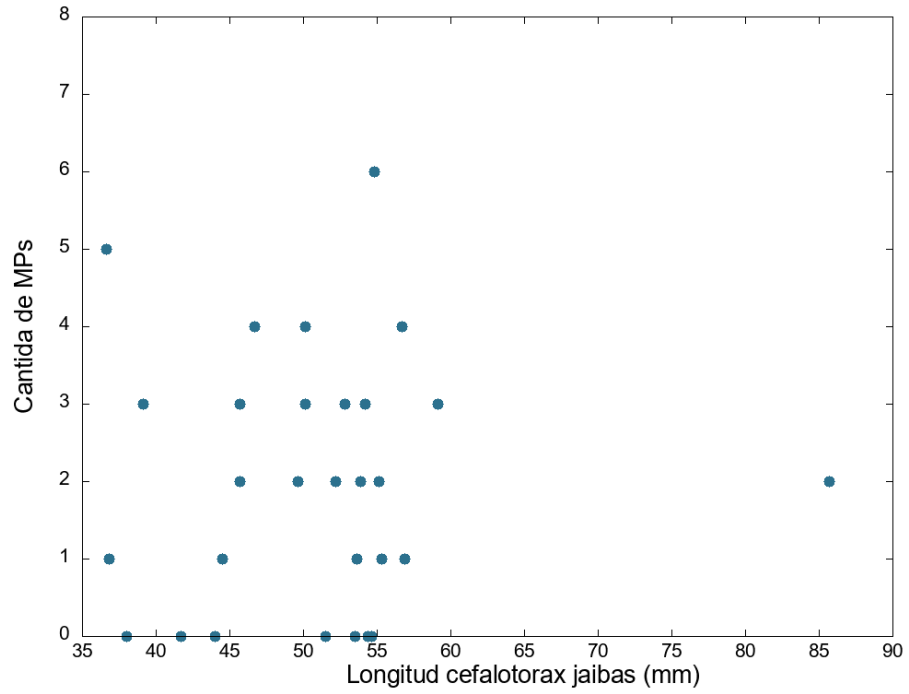
**Figura 5.3.** Talla promedio de las especies analizadas vs su correspondiente Talla MAD (talla a la que el 50% de los individuos han alcanzado la madurez sexual) [87]

Como se observa, los individuos que pertenecen a las especies *Centropomus viridis* y *Elops affinis* superan la talla de primera madurez sexual. De acuerdo con esto, son los únicos individuos adultos de toda la muestra en análisis. Sin embargo, únicamente se analiza un individuo de cada especie por lo que no se puede inferir que la población predominante de estas especies sea adulta.

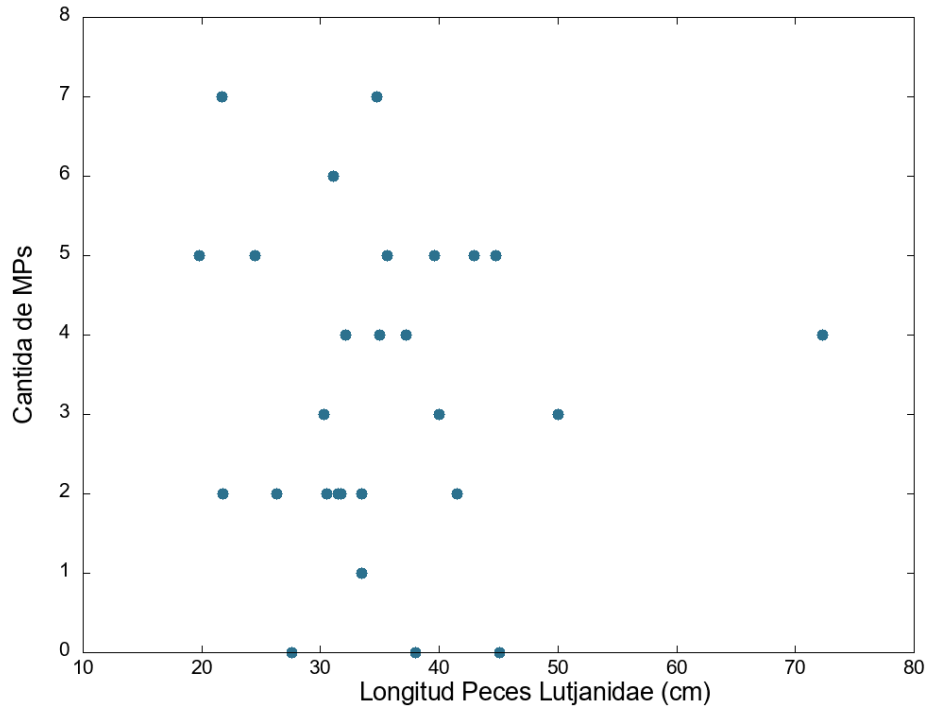
Con respecto al resto de individuos analizados, ninguno supera la talla de primera madurez sexual, lo cual implica que son organismos que no han llegado a ser adultos. Esto concuerda con lo esperado ya que los manglares son microhábitats estuarinos utilizados por estos organismos para el desarrollo de sus primeras fases de vida [103]. De acuerdo con la talla se espera que estos individuos juveniles tengan una dieta menos selectiva comparada con individuos adultos de su correspondiente especie, debido a su necesidad energética [110]. Por lo tanto, se puede hipotetizar que una dieta de este tipo conlleva a una mayor probabilidad de ingerir MPs.

Con el fin de indagar en lo discutido anteriormente se evalúa, mediante un análisis de dispersión, si hay una relación entre el tamaño de los individuos y la cantidad de MPs extraídos. Como se observa en el Cuadro 3.1, el promedio de la longitud del cefalotórax de las jaibas es de  $50.8 \pm 9.3$  mm con un rango entre 36.6 - 85.7 mm. De los peces únicamente se analiza la familia Lutjanidae, los cuales tienen una longitud promedio de  $36.2 \pm 6.7$  cm con un rango entre 26.3-50 cm. Esto debido a que es la familia con mayor representación de individuos. A pesar de que en todas las especies de peces predominan los individuos juveniles, no se deben comparar familias por sus diferencias biológicas. En el análisis de dispersión se observa que no hay una relación entre la talla de los organismos en análisis con la cantidad de MPs determinados en estos. En las Figura 5.4 y Figura 5.5 se muestran estos gráficos de dispersión.





**Figura 5.4.** Longitud del cefalotórax de las jaibas vs la cantidad de MPs extraídos



**Figura 5.5.** Longitud total de los pargos y la cantidad de MPs extraídos del sistema digestivo

Una de las razones por las cuales no se puede analizar este tipo de variables biológicas, es debido a que los individuos poseen parámetros biométricos muy similares, lo cual puede deberse al arte de pesca utilizado para capturarlos (tamaño del anzuelo, tipo de señuelo). Esto se puede evitar combinando artes de pesca para obtener todo el espectro de tallas. Además, se debe aumentar la cantidad de individuos por especie para así poder encontrar una relación entre la madurez sexual, su tipo de ingesta y la cantidad de MPs ingeridos.

## 5.2 IDENTIFICACIÓN DE LAS PARTÍCULAS EXTRAÍDAS

### *Identificación física (color, tamaño y forma) de los MPs*

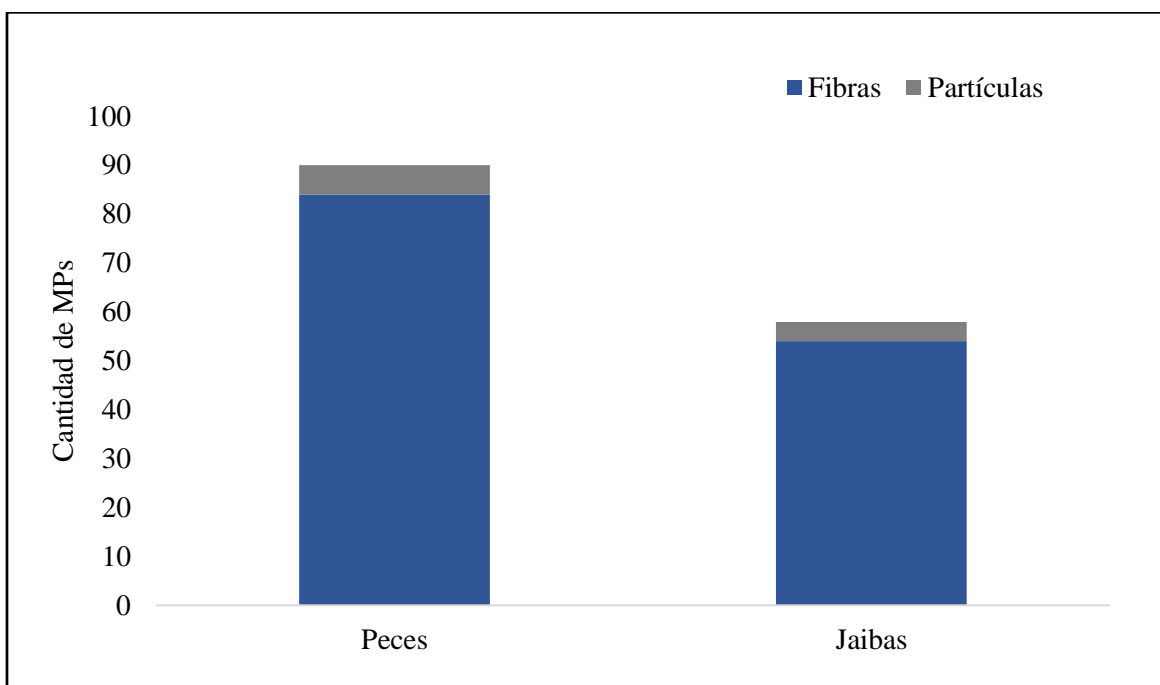
En el Cuadro 5.2 se presenta la caracterización base de todos los MPs encontrados:

**Cuadro 5.2.** Características físicas de los MPs encontrados

Parámetros	Peces	Jaibas
Rango de tamaño de los MPs	(5 254-128) $\mu\text{m}$	(3 597-101) $\mu\text{m}$
Promedio del tamaño de los MPs	1188 $\mu\text{m}$	1130 $\mu\text{m}$
Colores	Azul (predominante) café, negro, rojo, transparente, blanco	Negro y azul (predominantes), blanco, rojo, transparente
Cantidad de MPs extraídos con forma de fibras	84 (93%)	54 (93%)
Cantidad de MPs extraídos con forma de partículas	6 (7%)	4 (7%)

Como se observa, en las jaibas y en los peces se determina un amplio rango de tamaño de MPs. En ambos organismos se encuentra un promedio de aproximadamente 1 mm de tamaño. Además, el límite inferior determinado es cercano a los 100  $\mu\text{m}$ . El tamaño promedio de MPs es superior a 1 mm y la frecuencia de los colores (azul y negro) coinciden con lo reportado en otros estudios [27], [29], [45].

En este estudio se utilizan únicamente las categorías de fibra y partícula para describir la forma de los MPs debido a que no se encuentran otras formas de las piezas identificadas. En la Figura 5.6 MPs extraídos en el sistema digestivo según el organismo muestreado se muestra la cantidad de MPs extraídos en peces y jaibas según su forma.



**Figura 5.6** MPs extraídos en el sistema digestivo según el organismo muestreado

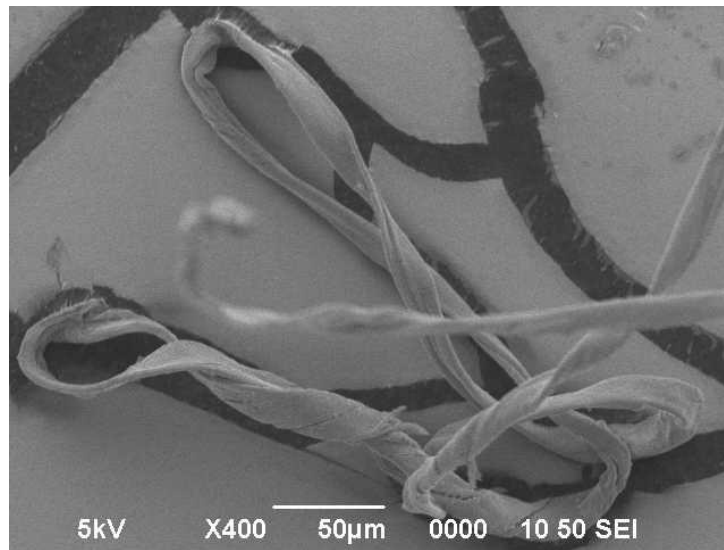
En los peces se determinan 90 MPs de los cuales 84 son fibras y 6 partículas. En las jaibas se identifican 58 MPs constituidos por 54 fibras y 4 partículas. En ambos organismos, esta proporción representa un 93% de fibras y un 7% partículas de los MPs extraídos. La predominancia de fibras coincide con lo reportado en otros estudios [23]–[28] en donde se atribuye la incidencia de esta forma de MPs con su la facilidad de transporte y distribución en el océano.

Al asociar este resultado con los valores discutidos en la sección anterior, se determina que no hay una diferencia significativa ( $p=0.203$ ) entre la ocurrencia de MPs entre los peces (organismos demersales) y las jaibas (organismos bentónicos), pero si una mayor cantidad de MPs por individuo en los peces. Debido a la densidad de las fibras, y su distribución en la columna de agua, se encuentran más disponibles para los peces demersales. Las especies de peces analizados en este estudio son carnívoros de alto nivel trófico y consumen crustáceos como las jaibas, por lo tanto, las posibles fuentes de ingesta de estas microfibras son las piezas distribuidas en la columna de agua y las que contienen los crustáceos. Por el contrario, las fuentes de ingesta de MPs de los crustáceos (como las jaibas) es menor ya que se encuentran en el fondo marino.

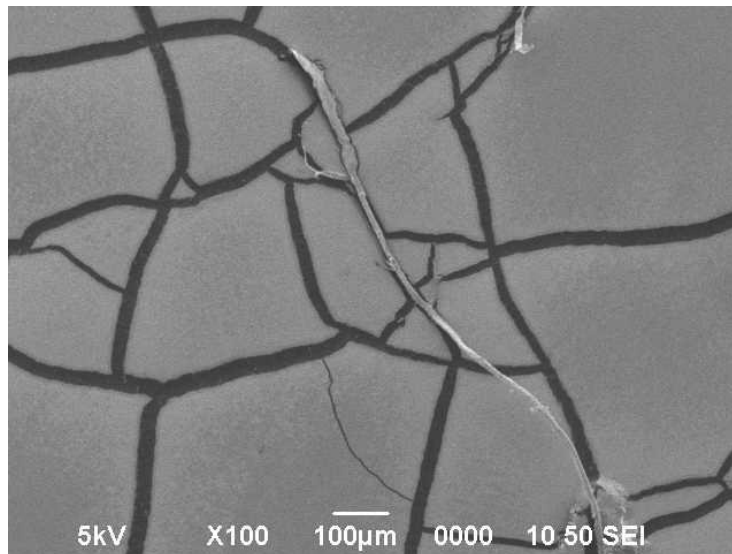
#### *Identificación fisicoquímica de los MPs*

Para determinar la composición de las partículas e identificar el tipo de polímero extraído se realizan pruebas con (1) SEM/EDS, (2) FTIR y (3) Raman. A continuación, se explican los resultados obtenidos de cada una de las técnicas, sus ventajas y desventajas según el tipo de muestra y características de las partículas.

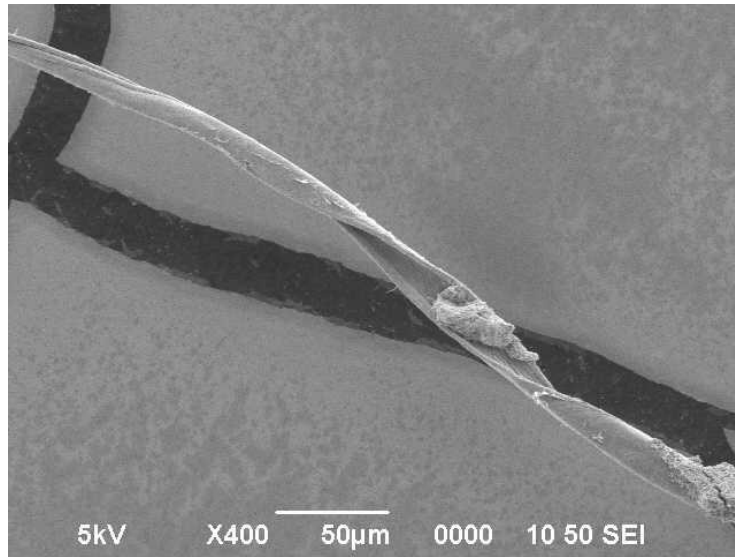
1. SEM/EDS. Se analizan 4 piezas aisladas del sistema digestivo de un pez *Lutjanus colorado* (F23). Las Figura 5.7, Figura 5.8, Figura 5.9 y Figura 5.10 representan una de las imágenes SEM obtenidas de las piezas analizadas y el Cuadro 5.3 se muestran los resultados obtenidos por la técnica EDS.



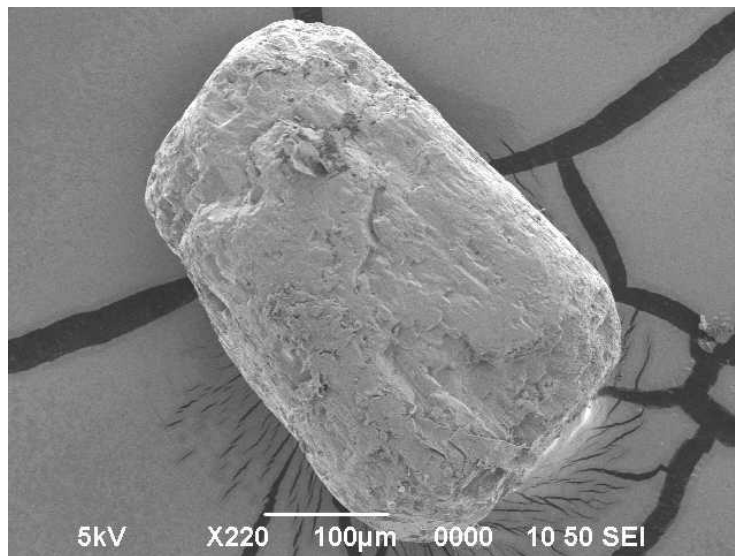
**Figura 5.7** Imagen obtenida por SEM del MP procedente de la muestra F23.1



**Figura 5.8** Imagen obtenida por SEM del MP procedente de la muestra F23.2



**Figura 5.9** Imagen obtenida por SEM del MP procedente de la muestra F23.3



**Figura 5.10** Imagen obtenida por SEM de la pieza procedente de la muestra F23.4

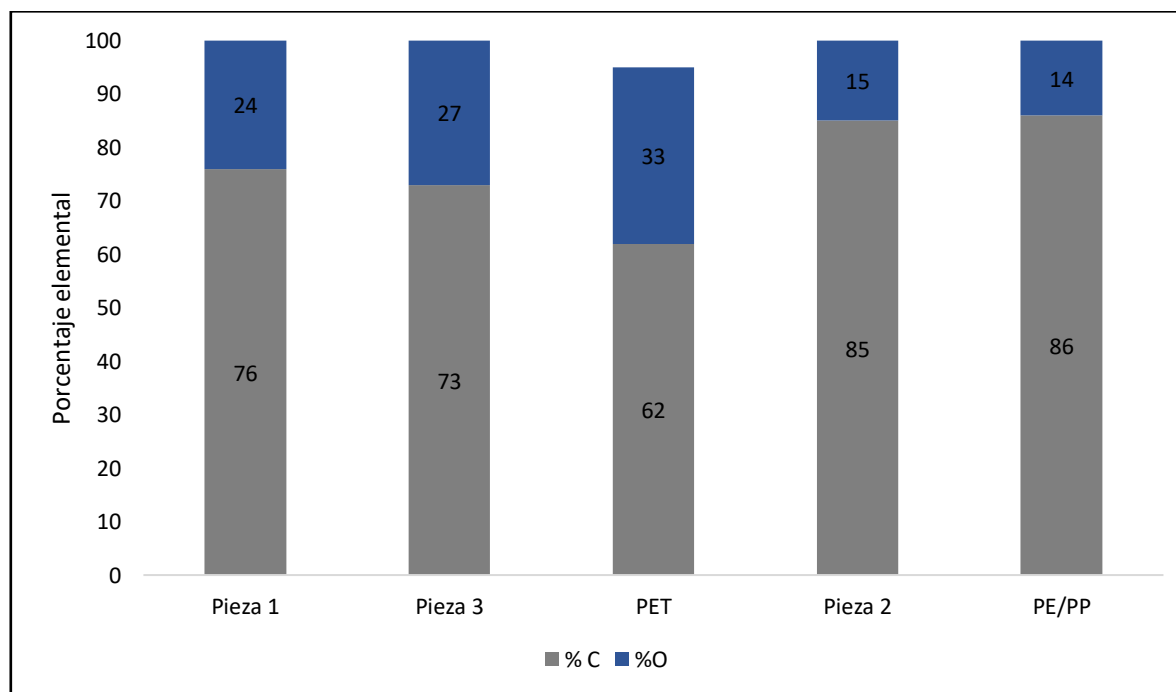
En el Cuadro A.2.1 del Apéndice 2 se muestran los resultados obtenidos por EDS. En estos resultados se observa la presencia de oro, debido a que la técnica requiere de un recubrimiento con este metal para fijar la muestra y ser analizada. Para el reporte de los resultados se ha removido el componente del oro de la composición elemental reportada. De cada muestra se realizan varias mediciones en diferentes puntos específicos, por lo tanto, en el Cuadro 5.3 se reporta un promedio de la composición elemental de las muestras analizadas. Se obtiene que las piezas 1 y 3 tienen una composición elemental de 76% C, 24% O<sub>2</sub> y 73% C, 27% O<sub>2</sub>,

respectivamente. Al comparar estos porcentajes con los reportados en el cuadro 5.4, se acercan a la composición elemental del PET (62% C, 33% O<sub>2</sub>). La pieza 2 tiene una composición elemental de 85% C, 15% O<sub>2</sub> lo cual coincide con el PE o PP (86 % C). Por último, la pieza 4 tiene un 11% de silicio lo cual indica que podría ser un mineral, por lo tanto, se descarta como MP y no es considerado en la cuantificación de MPs.

**Cuadro 5.3** Resultados obtenidos por EDS de piezas del sistema digestivo de los peces pargo *Lutjanus colorado*

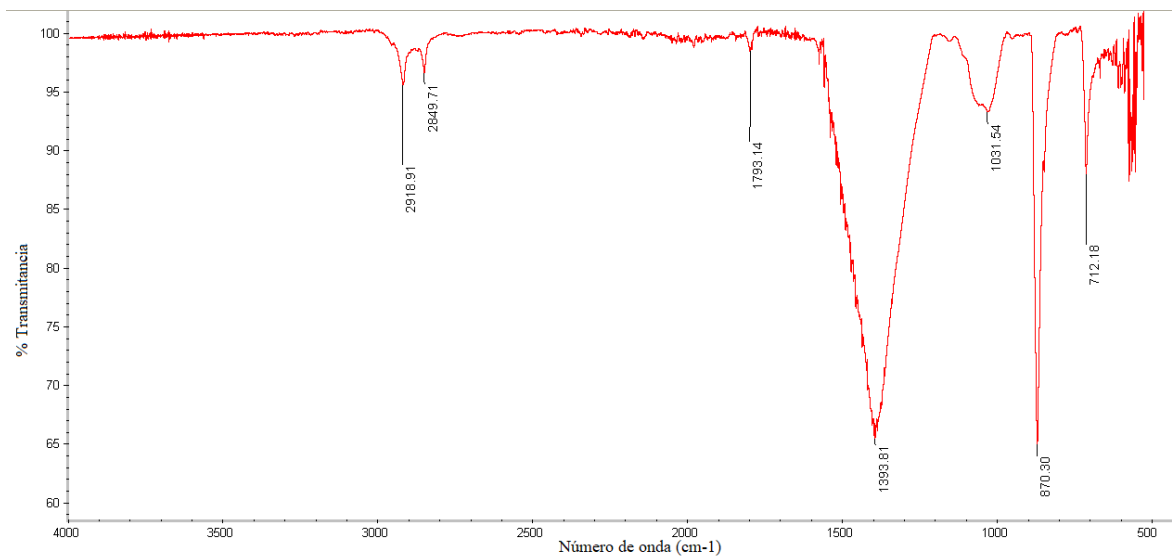
Pieza identificada	Composición elemental mediante EDS (% en masa)	Imagen obtenida por SEM
1	76 C, 24 O <sub>2</sub>	F23.1
2	85 C, 15 O <sub>2</sub>	F23.2
3	73 C, 27 O <sub>2</sub>	F23.3
4	52 C, 37 O <sub>2</sub> , 11 Si	F23.4

En la Figura 5.11 se muestra la similitud porcentual de las piezas analizadas con los polímeros sintéticos mencionados. Este tipo de fibras han sido reportadas por la mayoría de los estudios de MPs (ver Cuadro 3.2) y considerando su amplio uso en la industria y comercio a nivel mundial, son coincidencias esperadas.

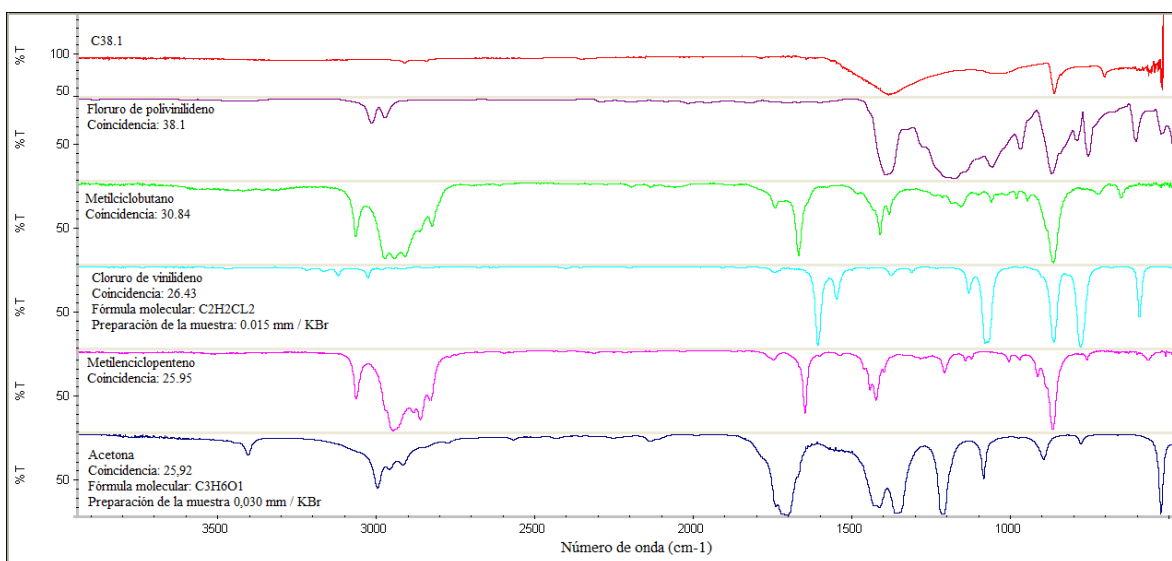


**Figura 5.11** Comparación del porcentaje elemental de las piezas analizadas con polímeros sintéticos comunes.

2. FTIR. Debido a las pequeñas dimensiones de las piezas individuales obtenidas en este trabajo, la mayoría de los MPs no se pueden identificar con esta técnica. En las Figura 5.13 y Figura 5.13 se observa respectivamente el espectro obtenido de la partícula aislada de una jaiba (individuo C38) y su correspondiente análisis de comparación con la base de datos del software. Se obtiene una serie posibles compuestos, pero ninguno de ellos supera el 41% de similitud, debido a la pequeña dimensión de la partícula no se cuenta con suficiente información para obtener una conclusión con un porcentaje de coincidencia aceptado (>50%).



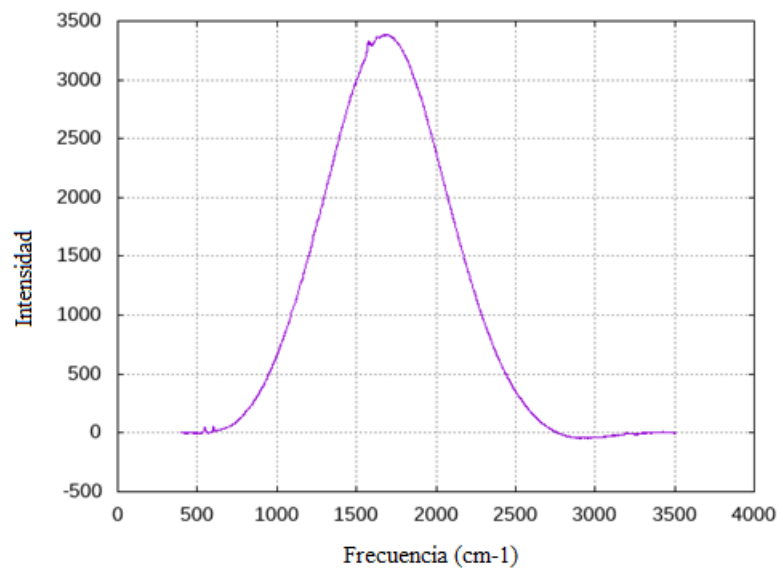
**Figura 5.12** Espectro obtenido de una pieza aislada de una jaiba (muestra con código C38.1)



**Figura 5.13** Resultados de la comparación de señales espectrales con la base de datos

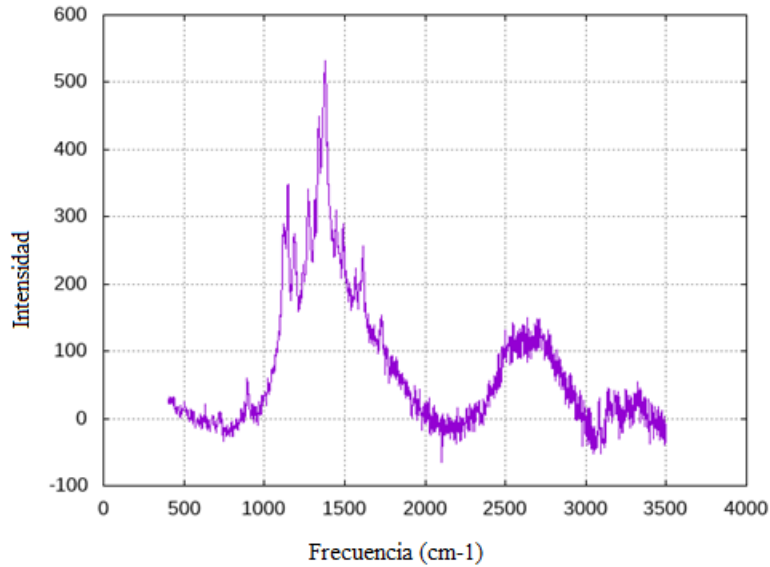
3. Raman. En total se realizaron análisis en 8 piezas aisladas (fibras y partículas). De estas piezas, 2 corresponden al cefalotórax de una jaiba (códigos C 38.1 y C 38.2), mientras que 3 y 2 piezas pertenecen a los sistemas digestivos de los peces con código F 23 y F 35 respectivamente, ambos de la especie *Lutjanus colorado*. La mayor dificultad encontrada para esta técnica es la falta de conocimiento sobre el tipo de polímero que se está analizando. Al no tener esta información, no se pueden establecer condiciones específicas en el equipo y se debe manejar con sumo cuidado para que no dañe la muestra.

En las Figura 5.14 y Figura 5.15 se observa que los resultados obtenidos no son exitosos debido a que las señales espectrales tienen alta fluorescencia y ruido de fondo, lo cual imposibilita una caracterización y comparación con las bases de datos conocidas.



**Figura 5.14** Espectro con alta fluorescencia obtenido de una pieza aislada de una jaiba (código C38.1)





**Figura 5.15** Espectro con ruido de fondo obtenido de la pieza aislada del sistema digestivo de un pez (código F35)

### 5.3 DETERMINACIÓN DE PRESENCIA DE MICROPLASTICOS EN LESIONES EN EL TEJIDO MUSCULAR POR MEDIO DE HISTOLOGIA

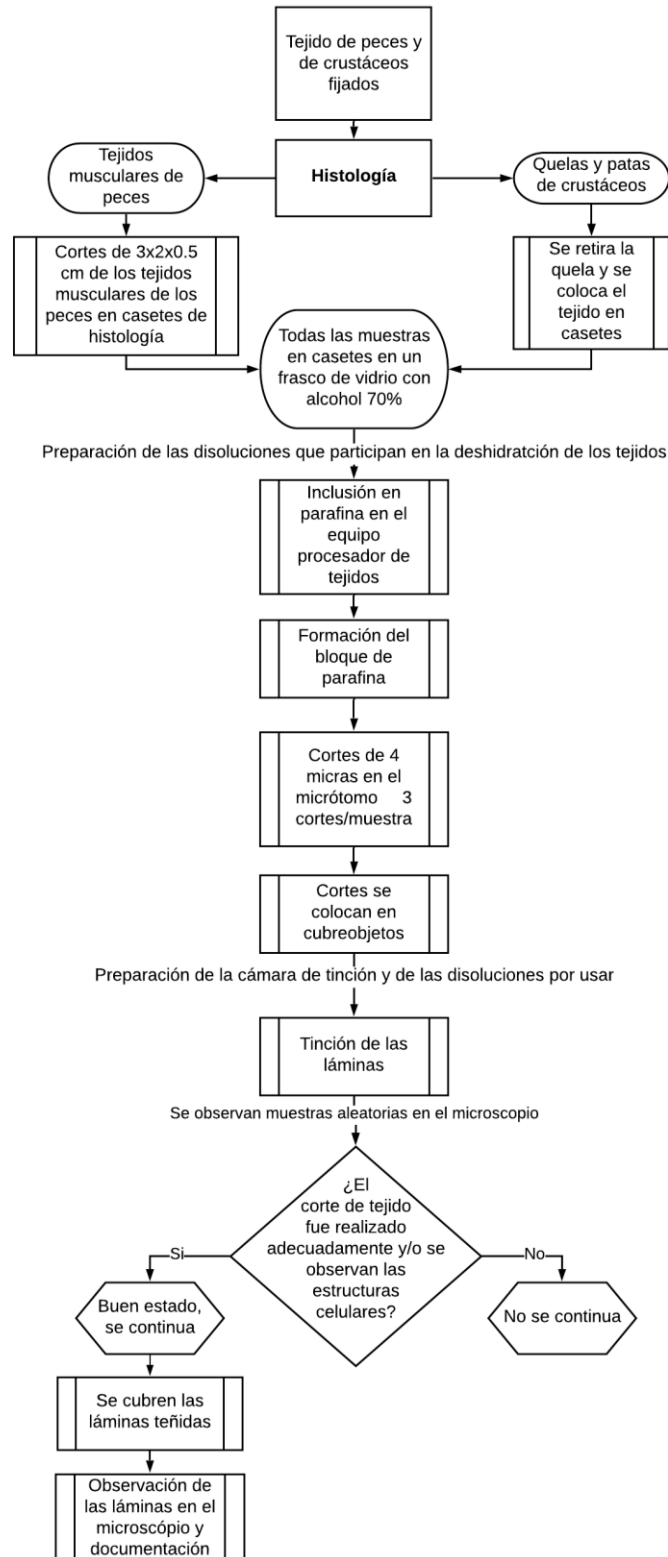
En este estudio se trabajó con dos tipos de muestras: tejido muscular de los peces y el tejido muscular de las quelas de jaibas. Se procesó el tejido muscular de las quelas de 29 crustáceos y 27 peces. De cada tejido muscular se realizaron dos cortes, obteniendo 114 de ellos. Esto con el fin de tener un corte extra en caso de fallar en el procedimiento. De cada tejido muscular se realizaron 3 láminas, obteniendo 171 láminas en total. Importante destacar que la técnica histológica no tuvo ningún cambio metodológico con respecto al usado en el Laboratorio de Histología de la UNA.

Con las láminas de tejido muscular de las jaibas se decide no finalizar el proceso de tinción y su posterior observación al microscopio debido al error en la etapa de fijación y preservación de las muestras descritas en la metodología: este error de fijación se evidenciaba en las láminas a simple vista en las primeras láminas fijadas, debido a que no se observaban estructuras típicas de una célula viva, si no se observaba una masa amorfa. Debido a esto, se estudia sobre las mejores técnicas para la fijación de los crustáceos, ya que, al ser seres vivos invertebrados con exoesqueleto, la preservación de tejidos resulta ser diferentes a los tejidos vertebrados como los peces. El procedimiento adecuado para preservar y fijar las muestras en caso de querer ser analizadas por histología es el siguiente:

- Fijación de tejido muscular blando: se debe agregar 5 ml de formalina al 10% por gramo de tejido.

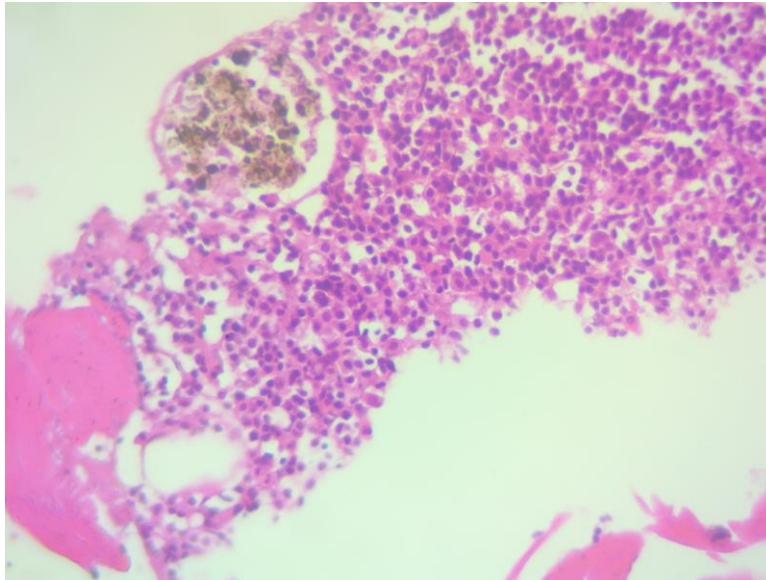
- Quelas con tejido muscular y exoesqueleto: Colocar la quela en fijador Davidson por 24 horas. Finalizado este periodo se debe retirar la quela con un bisturí y extraer el tejido para colocarlo en alcohol al 70%. Otra opción es retirar la quela *in situ*, colocar el tejido en los casetes (ver Figura A.3.2 en apéndice 3) y colocarlos en formalina al 10% en un frasco hasta su procesamiento [111].

La razón por la cual este procedimiento es distinto en crustáceos y peces es debido a que el tejido muscular de los crustáceos está rodeado y protegido en la estructura externa llamada exoesqueleto, por lo que el fijador con formalina no logra traspasar esa barrera física. Por esta razón, se debe usar un fijador específico para ablandar esta estructura y posteriormente tratar el tejido de interés [100]. En la Figura 5.16 Metodología adecuada para realizar procesar el tejido muscular de mediante histología se muestra el flujo del proceso adecuado que se debe realizar, para una óptima fijación.

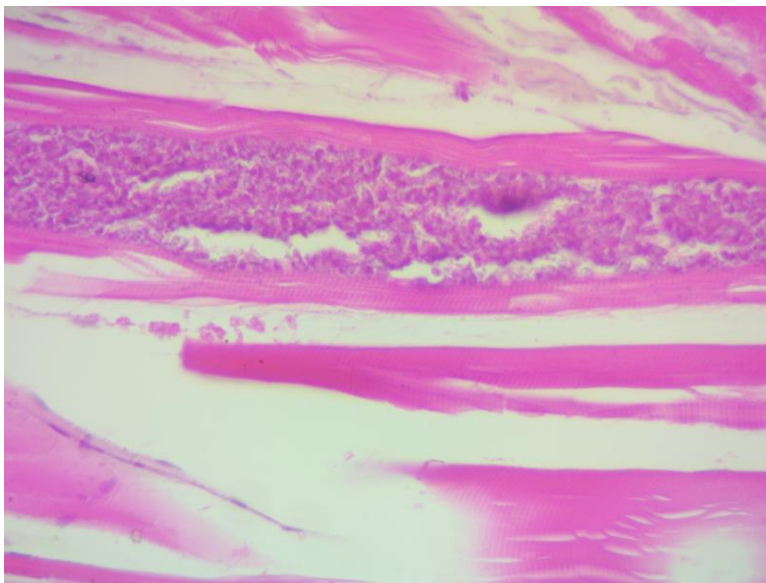


**Figura 5.16** Metodología adecuada para realizar procesar el tejido muscular de mediante histología

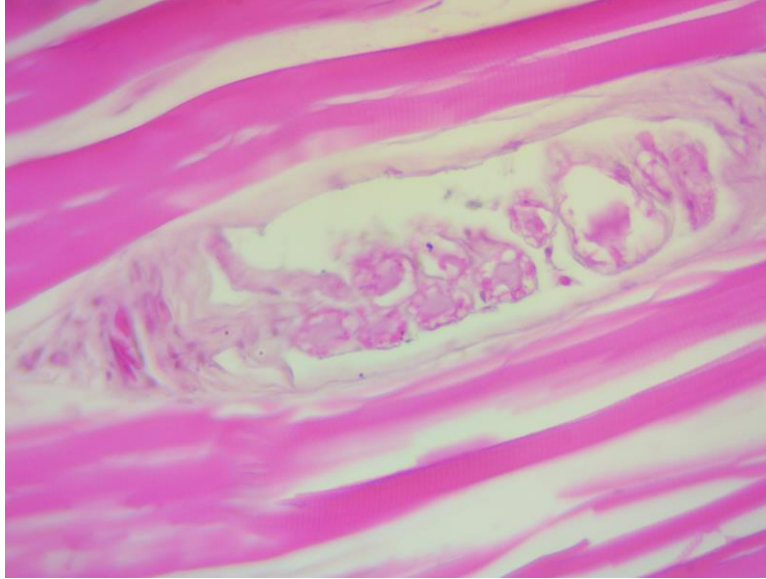
Con respecto a las láminas de los peces procesadas por el método de histología, se inicia el proceso de análisis, con el asesoramiento de la médica veterinaria especialista en tejidos animales, y literatura de apoyo [112]. En las siguientes imágenes se muestran algunas de las lesiones en los tejidos musculares de peces identificadas.



**Figura 5.17** Fibrosis en el tejido muscular de un pez *Lutjanus novemfasciatus*



**Figura 5.18** Congestión en el tejido muscular de un pez *Lutjanus colorado*



**Figura 5.19** Inflamación en el tejido muscular de un pez *Lutjanus colorado*

En las Figuras Figura 5.17, Figura 5.18 y Figura 5.19 se observan estas lesiones en el tejido muscular de distintos peces, sin embargo, estas lesiones no pueden ser atribuidas a MPs debido a que pueden ser ocasionadas por múltiples factores como: bacterias, parásitos y otros. Por lo tanto, para poder obtener mayor información de los posibles efectos de MPs en los tejidos musculares se deberían realizar pruebas a nivel de laboratorio en donde se aislen otros factores ambientales y poder atribuir las lesiones a estos contaminantes, como lo realizado en otras investigaciones [75]. En donde se evidencia que esta técnica puede aportar información valiosa sobre la forma en que se pueden translocar este tipo de contaminantes en los organismos. En el proceso de los análisis de las láminas histológicas, surge la pandemia mundial COVID-19, por lo que el proceso no ha concluido. Sin embargo, aunque se analice la totalidad de las láminas, se llega a la conclusión que ninguna lesión en el tejido muscular se puede asociar a las consecuencias del consumo de MPs por parte de los organismos, por lo que se recomienda que esta técnica sólo para ensayos de laboratorio o se use combinada con otras técnicas que permitan asociar estas lesiones observadas con la presencia de MP. Incluso se contempla el caso de que el MP este inmerso en los tejidos musculares, por lo que la metodología sería para nano plásticos, las cuales hasta el momento son incipientes.

#### 5.4 EVALUACIÓN DE LA METODOLOGÍA EMPLEADA Y LOS CAMBIOS REALIZADOS

A nivel nacional e internacional se desean estandarizar los métodos para determinar MPs en las diversas matrices ambientales. Debido a esto, en esta subsección se discutirá a detalle las dificultades enfrentadas y diversas pruebas realizadas con sus respectivos resultados.

Las principales razones por las cuales la metodología A no fue considerada exitosa son las siguientes:

- El residuo obtenido del proceso de digestión contiene mucha quitina producto de restos de exoesqueleto del organismo en estudio o de las presas ingeridas por el mismo. Tanto las jaibas como los peces fueron difíciles de procesar debido a este resultado. Las jaibas por ser crustáceos, con exoesqueleto articulado, formado principalmente de un carbohidrato llamado quitina. Y los peces, porque su dieta carnívora consiste en peces óseos y crustáceos (cangrejos/camarones) y en algunos casos, se encontraron dentro de los sistemas digestivos estas especies sin digerir. Lo cual implicaba que lo obtenido de la digestión química resultara con grandes volúmenes de quitina. Este residuo dificulta un trasvase cuantitativo, una adecuada visualización y extracción de MPs. (Ver Figura A.1.4 en apéndice 1).
- La previsualización propuesta para la extracción de los MPs implicaba trasvasar con agua destilada el residuo del tamiz a una placa Petri. Por ende, al observar mediante un estereoscopio y documentar las partículas que podrían ser MPs, además de los residuos, la placa Petri también contenía un volumen considerable de agua. El contenido de agua presente en la caja Petri dificulta su movimiento para la búsqueda de MPs ya que alteraba la posición de las partículas contenidas, lo cual incrementa la posibilidad de incurrir en un doble conteo o en no determinar MPs. Dependiendo de la cantidad de residuo por analizar, se podía consumir entre 7 hasta 20 minutos por muestra, debido a que se debía contar, medir y fotografiar cada una de las partículas halladas. Por estas razones se descartó por completo este paso en la elaboración de la metodología B. (Ver Figura A.1.5 en apéndice 1).
- Una vez realizada la previsualización en la placa Petri, se debía filtrar al vacío con un embudo Buchner la muestra a un papel filtro con un poro inferior a 63 micras. Este paso consumía mucho tiempo ya que debía asegurarse un trasvase cuantitativo de la muestra y en ocasiones esto era muy difícil debido a que los residuos tienden a adherirse al vidrio. Además, se observó que el papel filtro utilizado representaba una posible fuente de contaminación, especialmente de fibras debido a que su empaque no aislaba adecuadamente el papel del ambiente. Por lo tanto, al momento de utilizar el filtro se observaban a simple vista posibles fibras. Esto implica un gasto de insumos innecesario. Finalmente, el papel filtro dificulta la visualización y extracción de los posibles MPs de la muestra ya que aglomera el residuo en ciertas regiones, dificulta el paso de la luz y la aplicación de la guía mencionada anteriormente [19]. (Ver Figura A.1.6 en apéndice 1).

De acuerdo con los criterios descritos en la sección metodológica se realizó una búsqueda en la literatura para determinar si en otras investigaciones se presentaron este tipo de dificultades. Además, se consultó vía correo electrónico a diversos expertos internacionales que hubieran publicado artículos relacionados con la caracterización de MPs en medios acuosos y en biota para buscar soluciones a estos aspectos. Se informó por parte de los consultados, que no se han trabajado con este tipo de especies, por lo tanto, no se encontraron soluciones directas. Sin embargo, por el tipo de organismos que se estaban analizando (peces carnívoros con alto contenido de quitina en el sistema digestivo y crustáceos) no se pudo obtener una respuesta con solución a la problemática, pero si se recibieron diversas sugerencias que permitieron modificar la metodología previa con el fin de mejorar los resultados obtenidos. Con respecto a los problemas enfrentados se realizaron las siguientes pruebas:

- a) *Separación por densidad con una disolución de NaCl saturada* [95]. Como se mencionó anteriormente la densidad es una característica que puede servir para extraer polímeros de ciertas matrices, principalmente de muestras de agua y sedimentos. Inicialmente se separaron las muestras con un alto contenido de residuos después de la digestión para posteriormente dividir los residuos según su densidad. Se realizaron dos pruebas previas para comprobar su efectividad. Debido a la mezcla de residuos de exoesqueleto y principalmente de quitina, esta separación era poco efectiva, ya que estos son insolubles en agua y flotan con las posibles partículas de polímeros.
- b) En un estudio realizado en donde se evalúa la efectividad de diversas disoluciones en la *digestión* de biota se concluye que, el método más apropiado es el uso de una *disolución KOH/NaClO (30%)*. Se menciona que los principales factores considerados fueron la disponibilidad de los reactivos, la rapidez, el costo y efectividad de la digestión. Además, que puede ser una disolución apropiada para eliminar biopartículas, algas, partículas orgánicas floculadas y otros materiales ricos en proteínas y lípidos de origen biológico [61]. Sin embargo, se realizaron pruebas con tejido muscular y se determinó que la digestión no fue exitosa ya que después del tiempo recomendado (24-48 horas), las muestras no estaban completamente digeridas por lo que se descartó esta metodología.
- c) La quitina es un carbohidrato y un polímero natural, altamente insoluble en agua y en solventes orgánicos debido a los enlaces de hidrógeno que presenta la molécula. La quitina se vuelve soluble en ácidos inorgánicos diluidos cuando pierde el acetilo del grupo acetilamino, convirtiéndose en quitosano, el cual es soluble [97]. Debido a estas propiedades se propuso, un *tratamiento con ácido acético al 4% + agitación leve* durante 24 horas después de la digestión para solubilizar la quitina y limpiar las muestras con exceso de este biopolímero. Los resultados mostraron una disminución de la cantidad de

quitina, mejorando su visualización en el estereoscopio. Por lo tanto, se realizó este proceso en las muestras con código: F26, F23, F16, F17, F30, C5. En las Figuras A.1.19-24 del Apéndice 1 se muestran las imágenes antes y después del tratamiento. Cabe resaltar que se deben realizar más pruebas para ajustar las condiciones en que se aplicaría este tratamiento. Sin embargo, parece ser una opción viable para disminuir el problema de exceso de residuo de exoesqueleto en la visualización.

*Otros aspectos por considerar:*

La relación masa/volumen del peso del sistema digestivo y la disolución de KOH al 10% puede afectar el grado de digestión. Esto debido a que el peso del sistema digestivo puede variar significativamente debido al contenido estomacal del individuo en el momento de ser analizado. En la mayoría de los artículos no se reporta una relación o volumen de disolución según el peso. Sin embargo, durante el procesamiento de las muestras se planteó que podría llegar a ser una variable de gran influencia.

Una de las principales dificultades en la metodología para determinar MPs es la movilidad de las muestras para ser analizadas en diferentes institutos y/o laboratorios: La digestión química de los tejidos orgánicos se realizó en el laboratorio de Biotecnología de la UNA, en la sede de Heredia, esto debido a que no todos los laboratorios poseen el instrumento usado (agitador orbital). La extracción de MPs mediante estereoscopio fue realizada en los laboratorios de Entomología de la Escuela de Biología y en el Instituto Regional de Estudios en Sustancias Tóxicas (IRET) de la Escuela de Química, ambas pertenecen a la UNA, y poseían cámaras para fotografiar y medir los MPs. El traslado entre laboratorios se debe realizar con sumo cuidado, cubriendo las muestras en placas Petri envueltas en parafina para evitar contaminación y pérdidas.

Por otro lado, parte de las muestras (en placas Petri y suspendidas en agua destilada) fueron trasladadas al LANOTEC, ubicado en Pavas. Debido a la distancia entre sitios, el traslado es de mayor cuidado ya que se deben seguir las pautas mencionadas y asegurarse que el viaje no sea turbulento para evitar pérdidas y/o contaminación. En este laboratorio se desarrollaron las pruebas de separación por densidad, el tratamiento con ácido acético, el aislamiento de las piezas identificadas en viales y los análisis de identificación de FTIR o SEM/EDS. Finalmente, parte de las piezas aisladas y contenidas en viales de vidrio fueron trasladadas al TEC para su análisis mediante Raman.

Esto representa un desafío debido a que las piezas tienen una dimensión muy pequeña (101 hasta 3 500 micras) y su almacenamiento varía según el proceso que se debe realizar en cada instancia. El aislamiento de las muestras en viales y su posterior extracción es un paso que puede consumir mucho tiempo y se corre el riesgo de perder las muestras. Debido a que este



proyecto no abarca un trabajo coordinado entre estas instituciones, el avance de los análisis depende de la disponibilidad de tiempo y reactivos de cada institución y laboratorios. Específicamente el proceso de identificación tiene las complicaciones de ser muy pausado y difícil de coordinar.



## 6 CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

### Conclusiones

Este estudio demuestra que una mala gestión de los residuos sólidos afecta a especies marinas aun en zonas de conservación al determinar la presencia de MPs en el sistema digestivo de las especies analizadas. Las posibles fuentes de estos contaminantes son: los residuos arrastrados por corrientes marinas y ríos o por los pueblos cercanos al parque.

Los organismos en estudio del PNMB en su mayoría se encuentran en su etapa juvenil, y todos presentan una alta ocurrencia de MPs. Sin embargo, no se puede determinar si esto se debe a la ontogenia característica de este estadio debido a que no se analizaron individuos en su etapa adulta.

Se determina la presencia de estos contaminantes dentro del sistema digestivo del 89% de los individuos de peces analizados y en un 76% de los crustáceos analizados. En total se logran determinar  $3.75 \pm 1.70$  MPs/pez y  $2.64 \pm 1.36$  MPs/crustáceo. En concordancia con estudios previos como se mostró en el cuadro 3.2, predomina la presencia de fibras en los peces y en los crustáceos, ya que representan un 93% de los MPs determinados. Además, el tamaño promedio de MPs es de aproximadamente 1 mm y los colores predominantes son azul y negro.

No se obtuvieron resultados concluyentes mediante Raman y FTIR para la identificación fisicoquímica de las piezas extraídas. Por la técnica SEM se observa que las microfibras encontradas en este estudio coinciden visualmente con lo identificado en la literatura como MPs. Además, al acoplar el análisis con EDS, su relación carbono-oxígeno coincide con algunos de los polímeros sintéticos reportados y de mayor uso industrial.

Mediante la técnica de histología se identificaron lesiones en el tejido muscular de los peces, sin embargo, estas no se pueden vincular a MPs.

Los resultados de esta investigación permitieron el desarrollo de una metodología de extracción, la cual contribuye al conocimiento de un nuevo método para especies marinas de alto nivel trófico, el cual puede ser utilizado en otras regiones. (Consultar Figura A.1.25 en apéndice 1).

Se observa que el uso de ácido acético permite mejorar la separación de los MPs de los residuos post digestión de KOH de quitina/quitosanos recurrentes en especies carnívoras y con exoesqueleto.

En los diferentes estudios consultados no se encuentra definido el proceso de digestión con KOH al 10% en las muestras de biota, por lo que en algunos casos no se obtiene una digestión completa y fue necesario repetir la digestión y/o agregar más KOH.

## Recomendaciones

- Costa Rica cuenta con una serie de políticas públicas e instrumentos de gestión y planificación relacionada con la gestión de residuos, pero carece de un Plan Nacional de Residuos marinos. Por lo anterior, se insta a la formulación de un Plan Nacional de Acción para reducir la contaminación que llega a nuestros mares.
- Continuar con la determinación de MPs en especies marinas de alto nivel trófico en Costa Rica ya que nos proporcionan información sobre la incidencia de estos contaminantes en hábitats y especies de interés comercial. La cual puede ser utilizada para determinar indicadores ambientales, fuentes de contaminación y desarrollar métodos de gestión para abordar este problema.
- Estandarizar los métodos usados, para que los datos sean comparables y no se incurra en contaminación cruzada o pérdida de los MPs.
- Considerar en futuras investigaciones, obtener un tamaño de muestra que asegure un análisis estadístico robusto. En esta investigación se obtuvo un tamaño de muestra de 56 individuos, lo cual se considera suficiente estadísticamente bajo un mismo método; pero al separar las muestras en diferentes técnicas, debido a que se buscaba optimizar el proceso, se disminuyó la posibilidad de comparaciones estadísticamente robustas.
- Considerar los parámetros biométricos de las especies para analizar la ontogenia de las especies analizadas con la ocurrencia de MPs.
- Definir la relación óptima masa/volumen del proceso de digestión en biota con la disolución de KOH al 10%.
- En los casos en los que el residuo de la digestión con KOH al 10% tenga alto contenido de exoesqueletos, se recomienda dejar en agitación el residuo en una relación 1/30 masa/volumen de ácido acético al 4%.
- Utilizar la técnica de histología bajo un enfoque exploratorio en tejidos con mayor probabilidad de ser afectados por la presencia de MPs, como el hígado, que corresponde a un órgano filtrador e irrigador de otros órganos. Ya que esta técnica es costosa, consume mucho tiempo, se debe desarrollar gran pericia para realizarla y produce desechos tóxicos.
- Utilizar de técnicas de caracterización como  $\mu$ FTIR para determinar si el material es un polímero sintético. Aunque las técnicas de identificación de MPs mediante estereoscopio y SEM/EDS dan información valiosa a nivel visual y de composición elemental, estas no son concluyentes.



## 7 REFERENCIAS

- [1] M. Cole, P. Lindeque, C. Halsband, and T. S. Galloway, “Microplastics as contaminants in the marine environment: A review,” *Marine Pollution Bulletin*, vol. 62, no. 12, pp. 2588–2597, Dec-2011, doi: 10.1016/j.marpolbul.2011.09.025.
- [2] O. S. Ogunola, O. A. Onada, and A. E. Falaye, “Mitigation measures to avert the impacts of plastics and microplastics in the marine environment (a review).,” *Environ. Sci. Pollut. Res. Int.*, vol. 25, no. 10, pp. 9293–9310, Apr. 2018, doi: 10.1007/s11356-018-1499-z.
- [3] M. Wagner *et al.*, “Microplastics in freshwater ecosystems: what we know and what we need to know,” *Environ. Sci. Eur.*, vol. 26, no. 1, pp. 1–9, Dec. 2014, doi: 10.1186/s12302-014-0012-7.
- [4] A. M. Saley *et al.*, “Permalink Publication Date Microplastic accumulation and biomagnification in a coastal marine reserve situated in a sparsely populated area,” *Mar. Pollut. Bull.*, vol. 146, pp. 54–59, 2019, doi: 10.1016/j.marpolbul.2019.05.065.
- [5] T. Agardy, G. N. di Sciara, and P. Christie, “Mind the gap: Addressing the shortcomings of marine protected areas through large scale marine spatial planning,” *Mar. Policy*, vol. 35, no. 2, pp. 226–232, Mar. 2011, doi: 10.1016/j.marpol.2010.10.006.
- [6] Ministerio de Ambiente y Energía [MINAE], PNUD, MARVIVA, CRUSA, Ministerio de Salud [MS], and Camara Nacional de Comerciantes Detallistas y Afines, “Estrategia Nacional para la sustitución de plásticos de un solo uso,” 2017.
- [7] “Estudio pionero encuentra residuos de plástico en peces del Pacífico costarricense.” [Online]. Available: <https://www.ucr.ac.cr/noticias/2019/02/06/estudio-pionero-encuentra-residuos-de-plastico-en-peces-del-pacifico-costarricense.html>. [Accessed: 15-Nov-2019].
- [8] “El 68 % de todas las partículas encontradas en Jacó son estereofón.” [Online]. Available: [https://www.ucr.ac.cr/noticias/2019/10/18/el-68--de-todas-las-particulas-encontradas-en-jaco-son-estereofon.html?fbclid=IwAR11B8eJ08fCwGtC57GHPpBwKEZg4-e\\_WLfk76IBnx6cf\\_88YH6qczvOVNI](https://www.ucr.ac.cr/noticias/2019/10/18/el-68--de-todas-las-particulas-encontradas-en-jaco-son-estereofon.html?fbclid=IwAR11B8eJ08fCwGtC57GHPpBwKEZg4-e_WLfk76IBnx6cf_88YH6qczvOVNI). [Accessed: 15-Nov-2019].
- [9] “Microplástico podría llegar a su mesa a través de peces y crustáceos.” [Online]. Available: <https://www.larepublica.net/noticia/microplastico-podria-llegar-a-su-mesa-a-traves-de-peces-y-crustaceos>. [Accessed: 15-Nov-2019].
- [10] A. L. Andrady and M. A. Neal, “Applications and societal benefits of plastics,” doi: 10.1098/rstb.2008.0304.
- [11] A. L. Andrady, “Microplastics in the marine environment,” *Marine Pollution Bulletin*, vol. 62, no. 8, pp. 1596–1605, Aug-2011, doi: 10.1016/j.marpolbul.2011.05.030.
- [12] N. B. Hartmann *et al.*, “Are We Speaking the Same Language? Recommendations for a Definition and Categorization Framework for Plastic Debris,” *Environ. Sci. Technol.*, vol. 53, no. 3, pp. 1039–1047, Feb. 2019, doi: 10.1021/acs.est.8b05297.
- [13] J. P. G. L. Frias and R. Nash, “Microplastics: Finding a consensus on the definition,” *Mar. Pollut. Bull.*, vol. 138, pp. 145–147, Jan. 2019, doi: 10.1016/j.marpolbul.2018.11.022.

- [14] R. C. Thompson *et al.*, “Lost at Sea: Where Is All the Plastic?,” *Science* (80-. ), vol. 304, no. 5672, p. 838, May 2004, doi: 10.1126/science.1094559.
- [15] A. A. Shah, F. Hasan, A. Hameed, and S. Ahmed, “Biological degradation of plastics: A comprehensive review,” *Biotechnology Advances*, vol. 26, no. 3. Elsevier, pp. 246–265, 01-May-2008, doi: 10.1016/j.biotechadv.2007.12.005.
- [16] K. Enders, R. Lenz, J. A. Ivar do Sul, A. S. Tagg, and M. Labrenz, “When every particle matters: A QuEChERS approach to extract microplastics from environmental samples,” *MethodsX*, vol. 7, p. 100784, 2020, doi: 10.1016/j.mex.2020.100784.
- [17] GESAMP Joint Group of Experts on the Scientific Aspects of Marine Environmental Protection, “Sources, fate and effects of microplastics in the marine environment: a global assessment,” *Reports Stud. GESAMP*, vol. 90, p. 96, 2015, doi: 10.13140/RG.2.1.3803.7925.
- [18] N. C. Ory, P. Sobral, J. L. Ferreira, and M. Thiel, “Amberstripe scad *Decapterus muroadsi* (Carangidae) fish ingest blue microplastics resembling their copepod prey along the coast of Rapa Nui (Easter Island) in the South Pacific subtropical gyre,” *Sci. Total Environ.*, vol. 586, pp. 430–437, May 2017, doi: 10.1016/j.scitotenv.2017.01.175.
- [19] Z. Akdogan and B. Guven, “Microplastics in the environment: A critical review of current understanding and identification of future research needs,” *Environmental Pollution*, vol. 254. Elsevier Ltd, p. 113011, 01-Nov-2019, doi: 10.1016/j.envpol.2019.113011.
- [20] V. Hidalgo-Ruz, L. Gutow, R. C. Thompson, and M. Thiel, “Microplastics in the Marine Environment: A Review of the Methods Used for Identification and Quantification,” 2012, doi: 10.1021/es2031505.
- [21] M. Long *et al.*, “Interactions between microplastics and phytoplankton aggregates: Impact on their respective fates,” *Mar. Chem.*, vol. 175, pp. 39–46, Oct. 2015, doi: 10.1016/j.marchem.2015.04.003.
- [22] J. A. Ivar Do Sul and M. F. Costa, “The present and future of microplastic pollution in the marine environment,” *Environmental Pollution*, vol. 185. Elsevier, pp. 352–364, 01-Feb-2014, doi: 10.1016/j.envpol.2013.10.036.
- [23] A. A. Horton and S. J. Dixon, “Microplastics: An introduction to environmental transport processes,” *Wiley Interdiscip. Rev. Water*, vol. 5, no. 2, p. e1268, Mar. 2018, doi: 10.1002/wat2.1268.
- [24] J. P. G. L. Frias, J. Gago, V. Otero, and P. Sobral, “Microplastics in coastal sediments from Southern Portuguese shelf waters,” *Mar. Environ. Res.*, vol. 114, pp. 24–30, Mar. 2016, doi: 10.1016/j.marenvres.2015.12.006.
- [25] U. Aytan *et al.*, “First evaluation of neustonic microplastics in Black Sea waters,” *Mar. Environ. Res.*, vol. 119, pp. 22–30, Aug. 2016, doi: 10.1016/j.marenvres.2016.05.009.
- [26] D. Neves, P. Sobral, J. L. Ferreira, and T. Pereira, “Ingestion of microplastics by commercial fish off the Portuguese coast,” *Mar. Pollut. Bull.*, vol. 101, no. 1, pp. 119–126, Dec. 2015, doi: 10.1016/j.marpolbul.2015.11.008.
- [27] J. Bellas, J. Martínez-Armental, A. Martínez-Cámara, V. Besada, and C. Martínez-Gómez, “Ingestion of microplastics by demersal fish from the Spanish Atlantic and Mediterranean coasts,” *Mar. Pollut. Bull.*, vol. 109, no. 1, pp. 55–60, Aug. 2016, doi:



- 10.1016/j.marpolbul.2016.06.026.
- [28] O. Güven, K. Gökdağ, B. Jovanović, and A. E. Kideys, "Microplastic litter composition of the Turkish territorial waters of the Mediterranean Sea, and its occurrence in the gastrointestinal tract of fish," *Environ. Pollut.*, vol. 223, pp. 286–294, 2017, doi: 10.1016/j.envpol.2017.01.025.
- [29] A. L. Lusher, M. McHugh, and R. C. Thompson, "Occurrence of microplastics in the gastrointestinal tract of pelagic and demersal fish from the English Channel," *Mar. Pollut. Bull.*, vol. 67, no. 1–2, pp. 94–99, Feb. 2013, doi: 10.1016/j.marpolbul.2012.11.028.
- [30] S. Anbumani and P. Kakkar, "Ecotoxicological effects of microplastics on biota: a review," *Environmental Science and Pollution Research*, vol. 25, no. 15. Springer Verlag, pp. 14373–14396, 01-May-2018, doi: 10.1007/s11356-018-1999-x.
- [31] Y. K. Song *et al.*, "A comparison of microscopic and spectroscopic identification methods for analysis of microplastics in environmental samples," *Mar. Pollut. Bull.*, vol. 93, no. 1–2, pp. 202–209, Apr. 2015, doi: 10.1016/j.marpolbul.2015.01.015.
- [32] A. L. Lusher, V. Tirelli, I. O'Connor, and R. Officer, "Microplastics in Arctic polar waters: The first reported values of particles in surface and sub-surface samples," *Sci. Rep.*, vol. 5, Oct. 2015, doi: 10.1038/srep14947.
- [33] X. Sun, Q. Li, M. Zhu, J. Liang, S. Zheng, and Y. Zhao, "Ingestion of microplastics by natural zooplankton groups in the northern South China Sea," *Mar. Pollut. Bull.*, vol. 115, no. 1–2, pp. 217–224, Feb. 2017, doi: 10.1016/j.marpolbul.2016.12.004.
- [34] J. Li *et al.*, "Microplastics in mussels along the coastal waters of China," *Environ. Pollut.*, vol. 214, pp. 177–184, Jul. 2016, doi: 10.1016/j.envpol.2016.04.012.
- [35] J. Reichert, J. Schellenberg, P. Schubert, and T. Wilke, "Responses of reef building corals to microplastic exposure," *Environ. Pollut.*, vol. 237, pp. 955–960, Jun. 2018, doi: 10.1016/j.envpol.2017.11.006.
- [36] E. Hermsen, S. M. Mintenig, E. Besseling, and A. A. Koelmans, "Quality Criteria for the Analysis of Microplastic in Biota Samples: A Critical Review," *Environmental Science and Technology*, vol. 52, no. 18. American Chemical Society, pp. 10230–10240, 18-Sep-2018, doi: 10.1021/acs.est.8b01611.
- [37] M. C. Fossi *et al.*, "Fin whales and microplastics: The Mediterranean Sea and the Sea of Cortez scenarios," *Environ. Pollut.*, vol. 209, pp. 68–78, Feb. 2016, doi: 10.1016/j.envpol.2015.11.022.
- [38] M. A. Browne, A. Dissanayake, T. S. Galloway, D. M. Lowe, and R. C. Thompson, "Ingested microscopic plastic translocates to the circulatory system of the mussel, *Mytilus edulis* (L.)," *Environ. Sci. Technol.*, vol. 42, no. 13, pp. 5026–5031, Jul. 2008, doi: 10.1021/es800249a.
- [39] S. Abbasi, N. Soltani, B. Keshavarzi, F. Moore, A. Turner, and M. Hassanaghaei, "Microplastics in different tissues of fish and prawn from the Musa Estuary, Persian Gulf," *Chemosphere*, vol. 205, pp. 80–87, Aug. 2018, doi: 10.1016/j.chemosphere.2018.04.076.
- [40] P. Kolandhasamy, L. Su, J. Li, X. Qu, K. Jabeen, and H. Shi, "Adherence of microplastics to soft tissue of mussels: A novel way to uptake microplastics beyond ingestion," *Sci. Total Environ.*, vol. 610–611, pp. 635–640, Jan. 2018, doi:

- 10.1016/j.scitotenv.2017.08.053.
- [41] S. Rezania *et al.*, “Microplastics pollution in different aquatic environments and biota: A review of recent studies,” *Mar. Pollut. Bull.*, vol. 133, no. May, pp. 191–208, 2018, doi: 10.1016/j.marpolbul.2018.05.022.
- [42] C. Walkinshaw, P. K. Lindeque, R. Thompson, T. Tolhurst, and M. Cole, “Microplastics and seafood: lower trophic organisms at highest risk of contamination,” *Ecotoxicol. Environ. Saf.*, vol. 190, p. 110066, Mar. 2020, doi: 10.1016/j.ecoenv.2019.110066.
- [43] M. Compa, A. Ventero, M. Iglesias, and S. Deudero, “Ingestion of microplastics and natural fibres in *Sardina pilchardus* (Walbaum, 1792) and *Engraulis encrasicolus* (Linnaeus, 1758) along the Spanish Mediterranean coast,” *Mar. Pollut. Bull.*, vol. 128, pp. 89–96, Mar. 2018, doi: 10.1016/j.marpolbul.2018.01.009.
- [44] A. Markic *et al.*, “Double trouble in the South Pacific subtropical gyre: Increased plastic ingestion by fish in the oceanic accumulation zone,” *Mar. Pollut. Bull.*, vol. 136, pp. 547–564, Nov. 2018, doi: 10.1016/j.marpolbul.2018.09.031.
- [45] A. Anastasopoulou, C. Mytilineou, C. J. Smith, and K. N. Papadopoulou, “Plastic debris ingested by deep-water fish of the Ionian Sea (Eastern Mediterranean),” *Deep. Res. Part I Oceanogr. Res. Pap.*, vol. 74, pp. 11–13, Apr. 2013, doi: 10.1016/j.dsr.2012.12.008.
- [46] C. A. Peters, P. A. Thomas, K. B. Rieper, and S. P. Bratton, “Foraging preferences influence microplastic ingestion by six marine fish species from the Texas Gulf Coast,” *Mar. Pollut. Bull.*, vol. 124, no. 1, pp. 82–88, Nov. 2017, doi: 10.1016/j.marpolbul.2017.06.080.
- [47] N. Ory *et al.*, “Low prevalence of microplastic contamination in planktivorous fish species from the southeast Pacific Ocean,” *Mar. Pollut. Bull.*, vol. 127, pp. 211–216, Feb. 2018, doi: 10.1016/j.marpolbul.2017.12.016.
- [48] C. D. Rummel *et al.*, “Plastic ingestion by pelagic and demersal fish from the North Sea and Baltic Sea,” *Mar. Pollut. Bull.*, vol. 102, no. 1, pp. 134–141, Jan. 2016, doi: 10.1016/j.marpolbul.2015.11.043.
- [49] D. Wójcik-Fudalewska, M. Normant-Saremba, and P. Anastácio, “Occurrence of plastic debris in the stomach of the invasive crab *Eriocheir sinensis*,” *Mar. Pollut. Bull.*, vol. 113, no. 1–2, pp. 306–311, Dec. 2016, doi: 10.1016/j.marpolbul.2016.09.059.
- [50] N. A. C. Welden and P. R. Cowie, “Environment and gut morphology influence microplastic retention in langoustine, *Nephrops norvegicus*,” *Environ. Pollut.*, vol. 214, pp. 859–865, Jul. 2016, doi: 10.1016/j.envpol.2016.03.067.
- [51] F. Bessa *et al.*, “Occurrence of microplastics in commercial fish from a natural estuarine environment,” *Mar. Pollut. Bull.*, vol. 128, pp. 575–584, Mar. 2018, doi: 10.1016/j.marpolbul.2018.01.044.
- [52] F. Roos Lundström and A. Mårtensson, “The Journey of Plastic through Oceans : A study on quantifying micro plastic particles in ocean outside Costa Rican west coast,” *Bsc Thesis*, 2015.
- [53] “Universidad Nacional Práctica profesional supervisada de la estudiante : Katherine Coy Peña Biología con énfasis en Biotecnología ‘ Impacts of Microplastics near shore

- marine food webs ' Colaboración de la investigación de tesis doctoral de Dorothy Horn D," pp. 1–32, 2018.
- [54] P. M. Vásquez and Departamento, "Impacts of Microplastics on near shore marine food webs," 2018.
- [55] F. Bessa, T. Kogel, J. Frias, and A. Lusher, "Harmonized protocol for monitoring microplastics in biota," *Micropoll-Multilevel Assess. microplastics Assoc. Pollut. Balt. Sea View Proj.*, no. April, pp. 1–30, 2019, doi: 10.13140/RG.2.2.28588.72321/1.
- [56] A. Lusher, "Microplastics in the Marine Environment: Distribution, Interactions and Effects Amy Lusher," doi: 10.1007/978-3-319-16510-3\_10.
- [57] M. Cole *et al.*, "Microplastic Ingestion by Zooplankton," *Environ. Sci. Technol.*, vol. 47, no. 12, pp. 6646–6655, Jun. 2013, doi: 10.1021/es400663f.
- [58] S. L. Wright, R. C. Thompson, and T. S. Galloway, "The physical impacts of microplastics on marine organisms: a review.," *Environmental pollution (Barking, Essex : 1987)*, vol. 178. pp. 483–492, 2013, doi: 10.1016/j.envpol.2013.02.031.
- [59] C. L. Chen, *Regulation and management of marine litter*. 2015.
- [60] S. Kühn, B. van Werven, A. van Oyen, A. Meijboom, E. L. Bravo Rebolledo, and J. A. van Franeker, "The use of potassium hydroxide (KOH) solution as a suitable approach to isolate plastics ingested by marine organisms," *Mar. Pollut. Bull.*, vol. 115, no. 1–2, pp. 86–90, 2017, doi: 10.1016/j.marpolbul.2016.11.034.
- [61] K. Enders, R. Lenz, S. Beer, and C. A. Stedmon, "Extraction of microplastic from biota: Recommended acidic digestion destroys common plastic polymers," *ICES J. Mar. Sci.*, vol. 74, no. 1, pp. 326–331, 2017, doi: 10.1093/icesjms/fsw173.
- [62] R. R. Hurley, A. L. Lusher, M. Olsen, and L. Nizzetto, "Validation of a Method for Extracting Microplastics from Complex, Organic-Rich, Environmental Matrices," *Environ. Sci. Technol.*, vol. 52, no. 13, pp. 7409–7417, Jul. 2018, doi: 10.1021/acs.est.8b01517.
- [63] W. Fu, J. Min, W. Jiang, Y. Li, and W. Zhang, "Separation, characterization and identification of microplastics and nanoplastics in the environment," *Sci. Total Environ.*, vol. 721, p. 137561, 2020, doi: 10.1016/j.scitotenv.2020.137561.
- [64] D. A. Cooper and P. L. Corcoran, "Effects of mechanical and chemical processes on the degradation of plastic beach debris on the island of Kauai, Hawaii," *Mar. Pollut. Bull.*, vol. 60, no. 5, pp. 650–654, 2010, doi: 10.1016/j.marpolbul.2009.12.026.
- [65] J. I. Goldstein *et al.*, "Electron Beam—Specimen Interactions: Interaction Volume," in *Scanning Electron Microscopy and X-Ray Microanalysis*, Springer New York, 2018, pp. 1–14.
- [66] J. Lim, S. P. Yeap, H. X. Che, and S. C. Low, "Characterization of magnetic nanoparticle by dynamic light scattering," *Nanoscale Res. Lett.*, vol. 8, no. 1, pp. 1–14, Dec. 2013, doi: 10.1186/1556-276X-8-381.
- [67] A. Piruska *et al.*, "The autofluorescence of plastic materials and chips measured under laser irradiation," *Lab Chip*, vol. 5, no. 12, pp. 1348–1354, Dec. 2005, doi: 10.1039/b508288a.
- [68] Q. Chen *et al.*, "Enhanced uptake of BPA in the presence of nanoplastics can lead to neurotoxic effects in adult zebrafish," *Sci. Total Environ.*, vol. 609, pp. 1312–1321, 2017, doi: 10.1016/j.scitotenv.2017.07.144.

- [69] B. C. Smith, *Fundamentals of Fourier transform infrared spectroscopy*. CRC Press, 2011.
- [70] C. Guo *et al.*, “Quantitative analysis of binary polymorphs mixtures of fusidic acid by diffuse reflectance FTIR spectroscopy, diffuse reflectance FT-NIR spectroscopy, Raman spectroscopy and multivariate calibration,” *J. Pharm. Biomed. Anal.*, vol. 140, pp. 130–136, Jun. 2017, doi: 10.1016/j.jpba.2017.02.053.
- [71] M. G. J. Löder, M. Kuczera, S. Mintenig, C. Lorenz, and G. Gerdtts, “Focal plane array detector-based micro-Fourier-transform infrared imaging for the analysis of microplastics in environmental samples,” *Environ. Chem.*, vol. 12, no. 5, p. 563, 2015, doi: 10.1071/EN14205.
- [72] W. J. Shim, S. H. Hong, and S. E. Eo, “Identification methods in microplastic analysis: A review,” *Analytical Methods*, vol. 9, no. 9. Royal Society of Chemistry, pp. 1384–1391, 07-Mar-2017, doi: 10.1039/c6ay02558g.
- [73] “Characterization and Analysis of Microplastics, Volume 75 - 1st Edition.” [Online]. Available: <https://www.elsevier.com/books/characterization-and-analysis-of-microplastics/rocha-santos/978-0-444-63898-4>. [Accessed: 17-Mar-2020].
- [74] H. K. Imhof *et al.*, “Pigments and plastic in limnetic ecosystems: A qualitative and quantitative study on microparticles of different size classes,” *Water Res.*, vol. 98, pp. 64–74, Jul. 2016, doi: 10.1016/j.watres.2016.03.015.
- [75] A. Rodriguez-Seijo *et al.*, “Histopathological and molecular effects of microplastics in *Eisenia andrei* Bouché,” *Environ. Pollut.*, vol. 220, pp. 495–503, 2017, doi: 10.1016/j.envpol.2016.09.092.
- [76] L. La Beur *et al.*, “Baseline Assessment of Marine Litter and Microplastic Ingestion by Cold-Water Coral Reef Benthos at the East Mingulay Marine Protected Area (Sea of the Hebrides, Western Scotland),” *Front. Mar. Sci.*, vol. 6, no. MAR, p. 80, Mar. 2019, doi: 10.3389/fmars.2019.00080.
- [77] C. Panti, M. Giannetti, M. Bainsi, F. Rubegni, R. Minutoli, and M. C. Fossi, “Occurrence, relative abundance and spatial distribution of microplastics and zooplankton NW of Sardinia in the Pelagos Sanctuary Protected Area, Mediterranean Sea,” *Environ. Chem.*, vol. 12, no. 5, pp. 618–626, 2015, doi: 10.1071/EN14234.
- [78] “Sinac – Términos – Áreas Protegidas y Parques Nacionales de Costa Rica.” [Online]. Available: <https://areasyparques.com/areasprotegidas/sinac-terminos/>. [Accessed: 16-Mar-2020].
- [79] “Parque Nacional Marino las Baulas – Áreas Protegidas y Parques Nacionales de Costa Rica.” [Online]. Available: <https://areasyparques.com/areasprotegidas/marino-las-baulas/>. [Accessed: 16-Mar-2020].
- [80] INCOPECA, “Ajdip/026-2018,” no. 506, 2019.
- [81] J. M. Posada, M. Flores, A. Kok, and J. Snow, “Guía de Especies.”
- [82] INCOPECA, *AJDIP/289-2017*, no. 506. 2017.
- [83] “Shorefishes - The Fishes - Species.” [Online]. Available: <https://biogeodb.stri.si.edu/sftep/es/thefishes/species/1246>. [Accessed: 15-Mar-2020].
- [84] L. Ribera, B. Heredia, E. L. Atun, D. E. Las, and C. Buenas, “cámara nacional de exportadores de productos pesqueros COSECHAS MARINAS S.A. PRODUCTOS

DEL MAR TICO, S.A. Procesamiento y Exportación de Productos Marítimos Deshidratados.”

- [85] “Shorefishes - The Fishes - Species.” [Online]. Available: <https://biogeodb.stri.si.edu/sfstep/es/thefishes/species/1088>. [Accessed: 15-Mar-2020].
- [86] “Shorefishes - The Fishes - Species.” [Online]. Available: <https://biogeodb.stri.si.edu/sfstep/es/thefishes/species/286>. [Accessed: 15-Mar-2020].
- [87] E. G. Cabral Solís, “Efectos antropocénicos sobre la acidez del agua, diversidad y abundancia de la fauna neotónica de la Laguna de Cuyutlán, Colima, México: Recomendaciones para su uso,” Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, 2011.
- [88] “Guía de identificación de filetes de pescado y mariscos.”
- [89] “Shorefishes - The Fishes - Species.” [Online]. Available: <https://biogeodb.stri.si.edu/sfstep/es/thefishes/species/1320>. [Accessed: 15-Mar-2020].
- [90] “Guía de identificación Proyecto Puertos,” 2014.
- [91] M. Tejada Yábar and J. López Ramon, “Evaluación de la presencia de nematodos del género Anisakis en los pescados de acuicultura marina española,” 2012.
- [92] M. & E. R. Institute, “Guide to Microplastic Identification (Dissecting Microscope),” p. 14, 2012.
- [93] F. M. Baalkhuyur *et al.*, “Microplastic in the gastrointestinal tract of fishes along the Saudi Arabian Red Sea coast,” *Mar. Pollut. Bull.*, vol. 131, no. April, pp. 407–415, 2018, doi: 10.1016/j.marpolbul.2018.04.040.
- [94] P. Agamuthu, “Marine debris, plastics, microplastics and nano-plastics: What next?,” *Waste Management and Research*, vol. 36, no. 10. SAGE Publications Ltd, pp. 869–871, 01-Oct-2018, doi: 10.1177/0734242X18796770.
- [95] A. G. M. Caron, C. R. Thomas, K. L. E. Berry, C. A. Motti, E. Ariel, and J. E. Brodie, “Validation of an optimised protocol for quantification of microplastics in heterogeneous samples: A case study using green turtle chyme,” *MethodsX*, vol. 5, pp. 812–823, 2018, doi: 10.1016/j.mex.2018.07.009.
- [96] B. De Witte *et al.*, “Quality assessment of the blue mussel (*Mytilus edulis*): Comparison between commercial and wild types,” *Mar. Pollut. Bull.*, vol. 85, no. 1, pp. 146–155, Aug. 2014, doi: 10.1016/j.marpolbul.2014.06.006.
- [97] M. Á. Ramírez, A. T. Rodríguez, L. Alfonso, and C. Peniche, “La quitina y sus derivados, biopolímeros con potencialidades de aplicación agrícola,” 2010.
- [98] A. P. Ziarsolo and E. A. Sánchez, “Una introducción a los textiles artificiales en las colecciones de indumentaria del siglo XX y su conservación,” *Ge-Conservacion*, vol. 2016, no. 9, pp. 31–44, 2016.
- [99] A. Rodriguez-Seijo *et al.*, “Histopathological and molecular effects of microplastics in *Eisenia andrei* Bouché,” *Environ. Pollut.*, vol. 220, no. Pt A, pp. 495–503, Jan. 2017, doi: 10.1016/j.envpol.2016.09.092.
- [100] C. Eduardo Montalvo, “TÉCNICA HISTOLÓGICA.”
- [101] P. D. E. M. D. E. L. O. S. Crustáceos, “Protocolo de muestreo de los crustáceos 1,” 2006.

- [102] J. C. Picón Cruz and V. J. Baltodano Zúñiga, “Planificación turística en zonas costeras de Costa Rica. Algunas referencias a Playa Tamarindo (Santa Cruz, Guanacaste),” *InterSedes*, vol. 7, no. 13, pp. 149–170, 2006.
- [103] C. Calderón, O. Aburto, and E. Ezcurra, “El valor de los manglares,” *Biodiversitas*, no. 82, pp. 1–6, 2009.
- [104] E. Proyecto and B. Marino, “CARACTERIZACIÓN ECOLÓGICA DEL SECTOR MARINO DEL PARQUE NACIONAL MARINO LAS BAULAS DE GUANACASTE Serie Técnica 15,” 2015.
- [105] P. Li, X. Wang, M. Su, X. Zou, L. Duan, and H. Zhang, “Characteristics of Plastic Pollution in the Environment: A Review,” *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*. Springer, 2020, doi: 10.1007/s00128-020-02820-1.
- [106] A. A. Koelmans, N. H. Mohamed Nor, E. Hermsen, M. Kooi, S. M. Mintenig, and J. De France, “Microplastics in freshwaters and drinking water: Critical review and assessment of data quality,” *Water Research*, vol. 155. Elsevier Ltd, pp. 410–422, 15-May-2019, doi: 10.1016/j.watres.2019.02.054.
- [107] J. Cortés, C. Rica, E. De Biología, U. D. C. Rica, S. José, and C. Rica, “Los ecosistemas marinos del Pacífico sur de Costa Rica: estado del conocimiento y perspectivas de manejo,” no. June, 2016.
- [108] P. Carbonara and M. Follesa, *Handbook on fish age determination: a Mediterranean experience*, vol. 98, no. April. 2019.
- [109] W. G. Canto-Maza and M. E. Vega-Cendejas, “Distribution, abundance and alimentary preferences of the fish *Opsanus phobetron* (Batrachoididae) at the Chelem coastal lagoon, Yucatan, Mexico,” *Rev. Biol. Trop.*, vol. 55, no. 3–4, pp. 979–988, 2007, doi: 10.15517/rbt.v55i3-4.33044.
- [110] A. D. G. Baxter-Jones and L. B. Sherar, “Growth and maturation,” *Paediatr. Exerc. Physiol.*, pp. 1–26, 2007, doi: 10.1016/B978-0-443-10260-8.50006-0.
- [111] J. W. Martin, “Collecting and processing crustaceans: an introduction,” *J. Crustac. Biol.*, vol. 36, no. 3, pp. 393–395, Apr. 2016, doi: 10.1163/1937240X-00002436.
- [112] A. Rodríguez-Seijo *et al.*, “Histopathological and molecular effects of microplastics in *Eisenia andrei* Bouché,” *Environ. Pollut.*, vol. 220, no. Pt A, pp. 495–503, Jan. 2017, doi: 10.1016/j.envpol.2016.09.092.

## 8 APÉNDICES

### 8.1 APÉNDICE 1: PROCESAMIENTO DE LAS MUESTRAS



**Figura A 1.1** Área de procesamiento de las muestras



**Figura A 1.2** Documentación de cada individuo

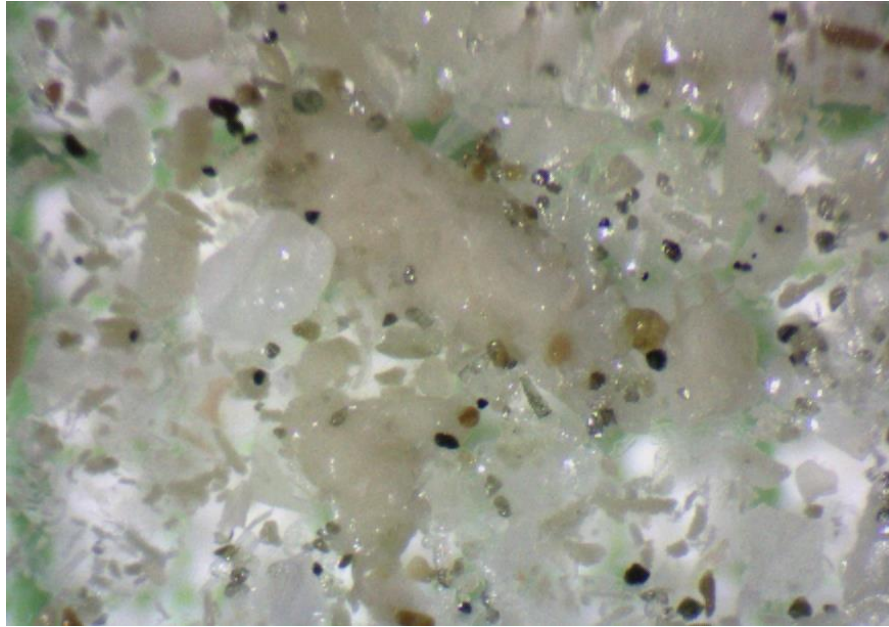


**Figura A 1.3** Incisión para retirar el sistema digestivo de los peces

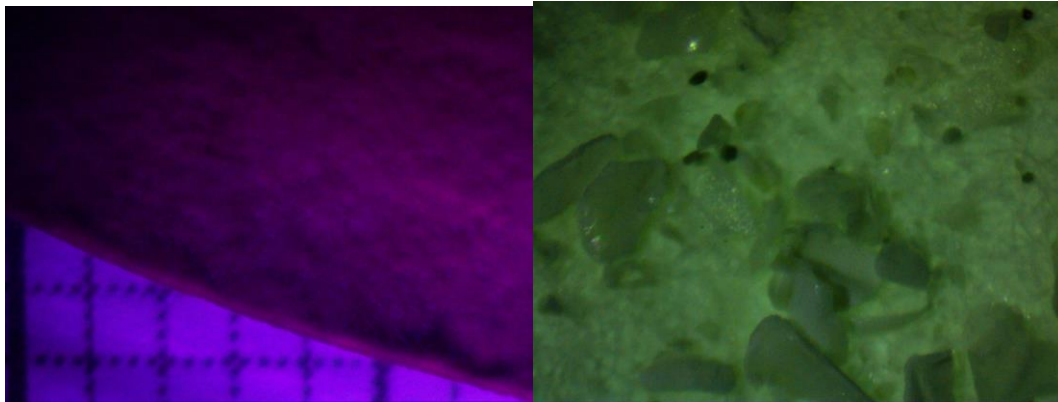


**Figura A 1.4** Residuos de quitina, exoesqueleto y una jaiba dentro del sistema digestivo de peces

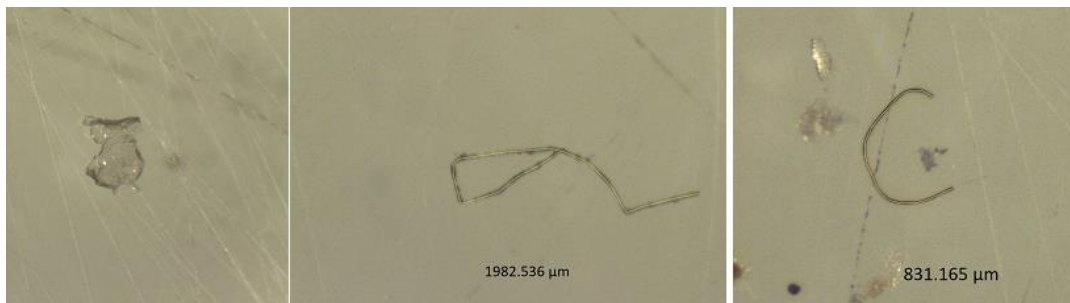




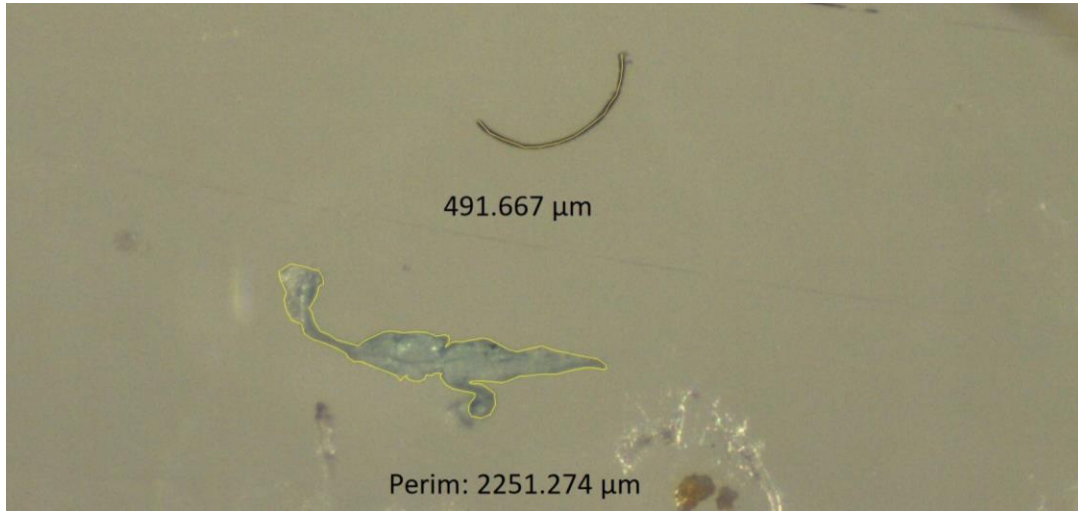
**Figura A 1.5** Previsualización de los residuos de la digestión



**Figura A 1.6** Dificultades al visualizar los residuos en papel filtro



**Figura A 1.7** MPs encontrados en el control 6



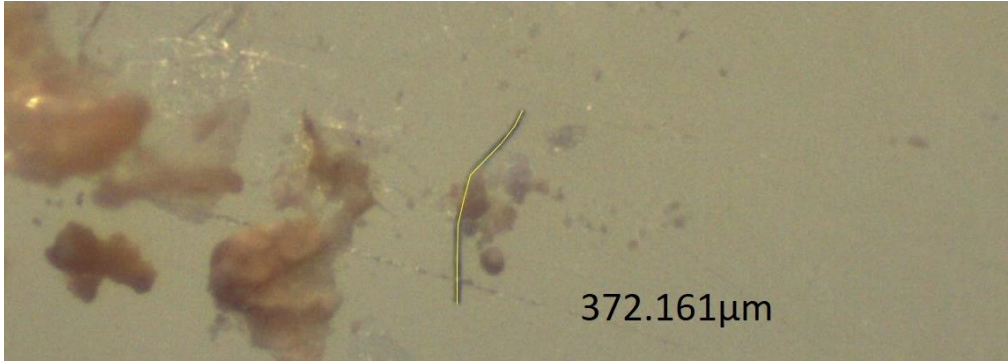
**Figura A 1.8.** MPs extraídos de la muestra F31



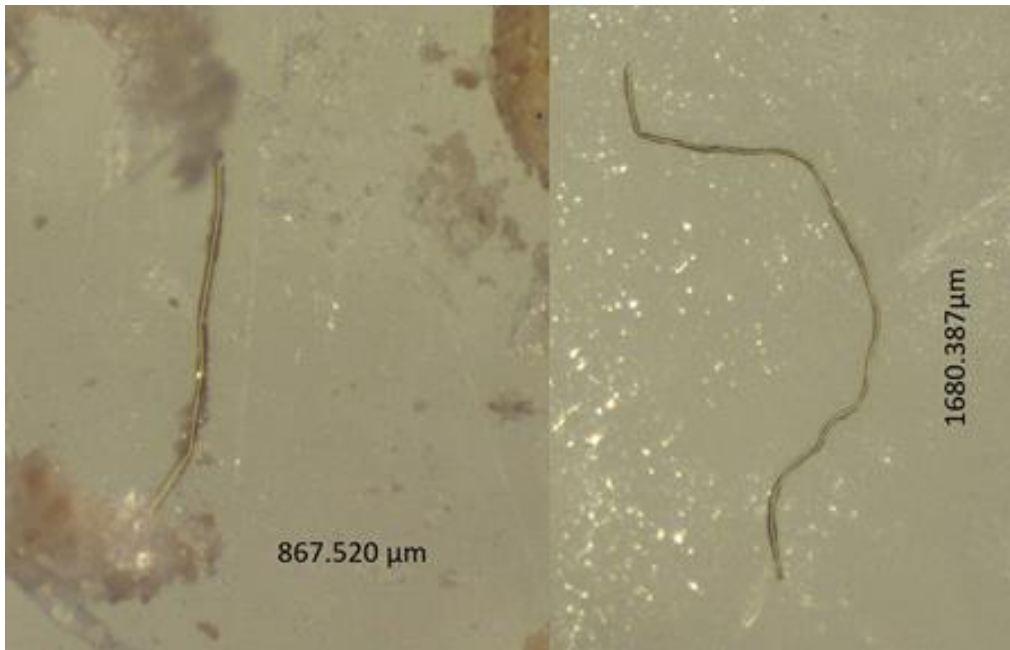
**Figura A 1.9.** MPs extraídos de la muestra F32



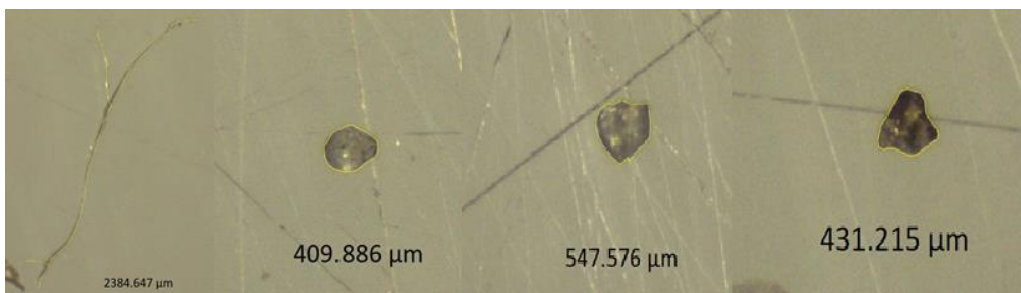
**Figura A 1.10.** MPs extraídos de la muestra F33



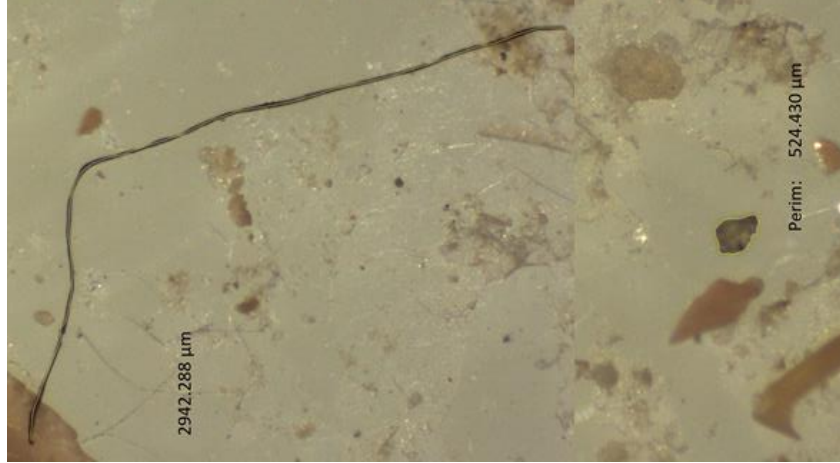
**Figura A 1.11.** MPs extraídos de la muestra F34



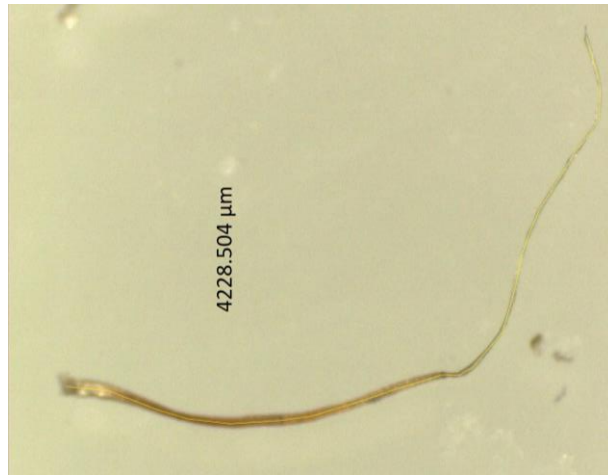
**Figura A 1.12.** MPs extraídos de la muestra F35



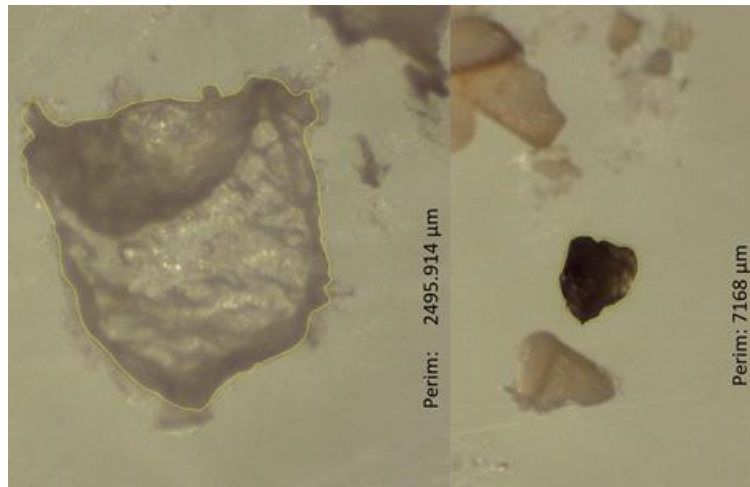
**Figura A 1.13.** MPs extraídos de la muestra F36



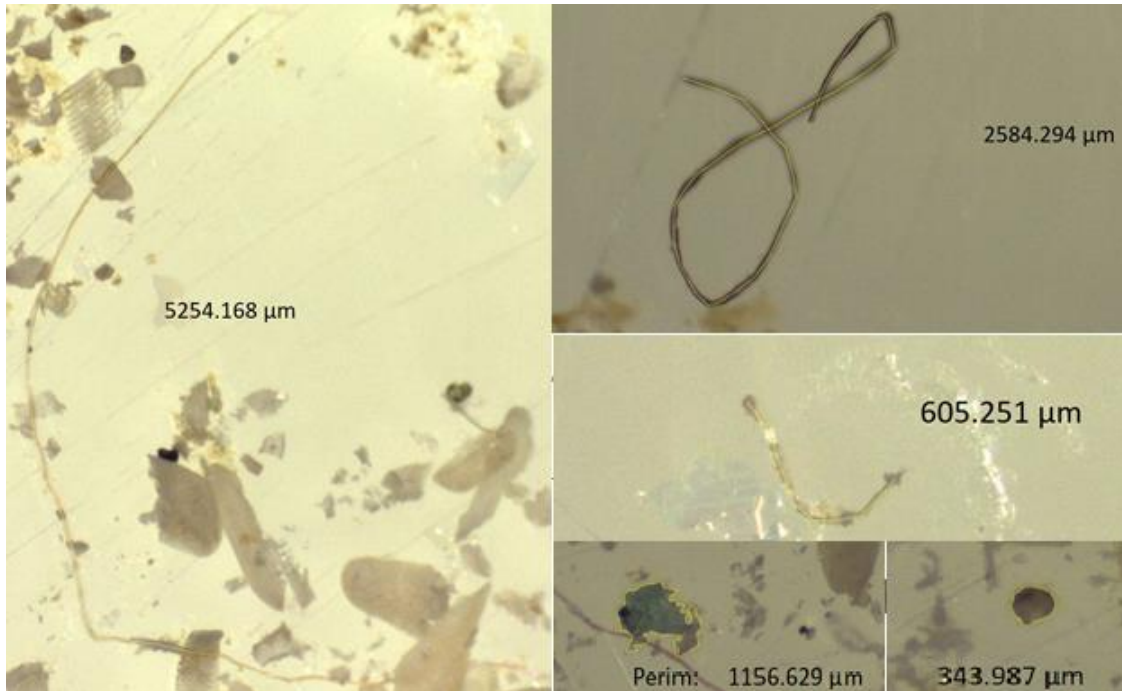
**Figura A 1.14.** MPs extraídos de la muestra F38



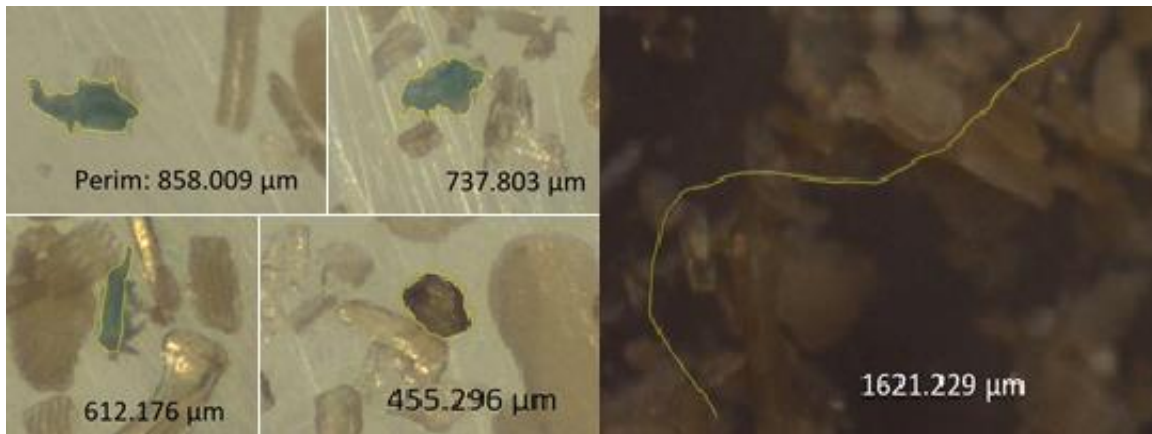
**Figura A 1.15.** MPs extraídos de la muestra F39



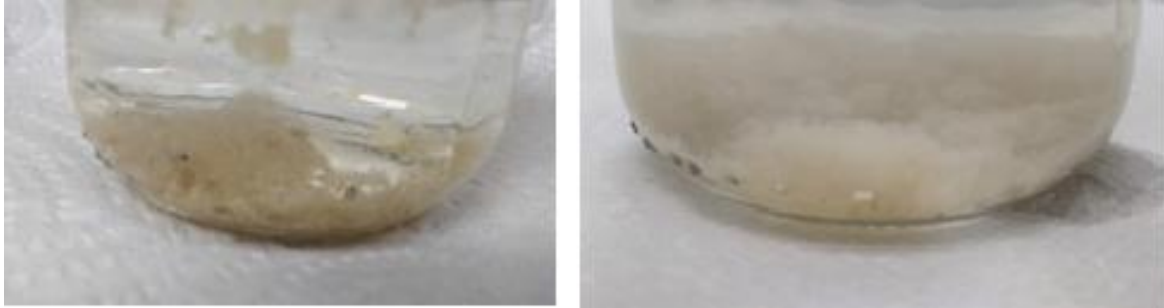
**Figura A 1.16.** MPs extraídos de la muestra F40



**Figura A 1.17.** MPs extraídos de la muestra F41



**Figura A 1.18.** MPs extraídos de la muestra F42



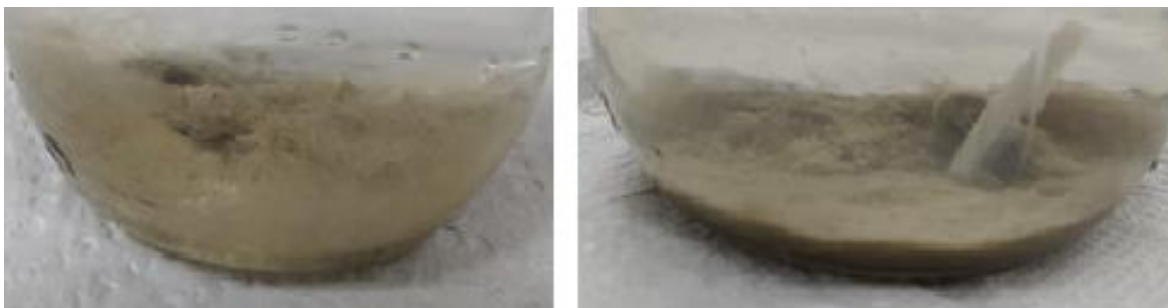
**Figura A 1.19.** Residuos de la digestión química pre y post tratamiento con ácido acético al 5% en la muestra F26



**Figura A 1.20** Residuos de la digestión química pre y post tratamiento con ácido acético al 5% en la muestra F17



**Figura A 1.21** Residuos de la digestión química pre y post tratamiento con ácido acético al 5% en la muestra F30



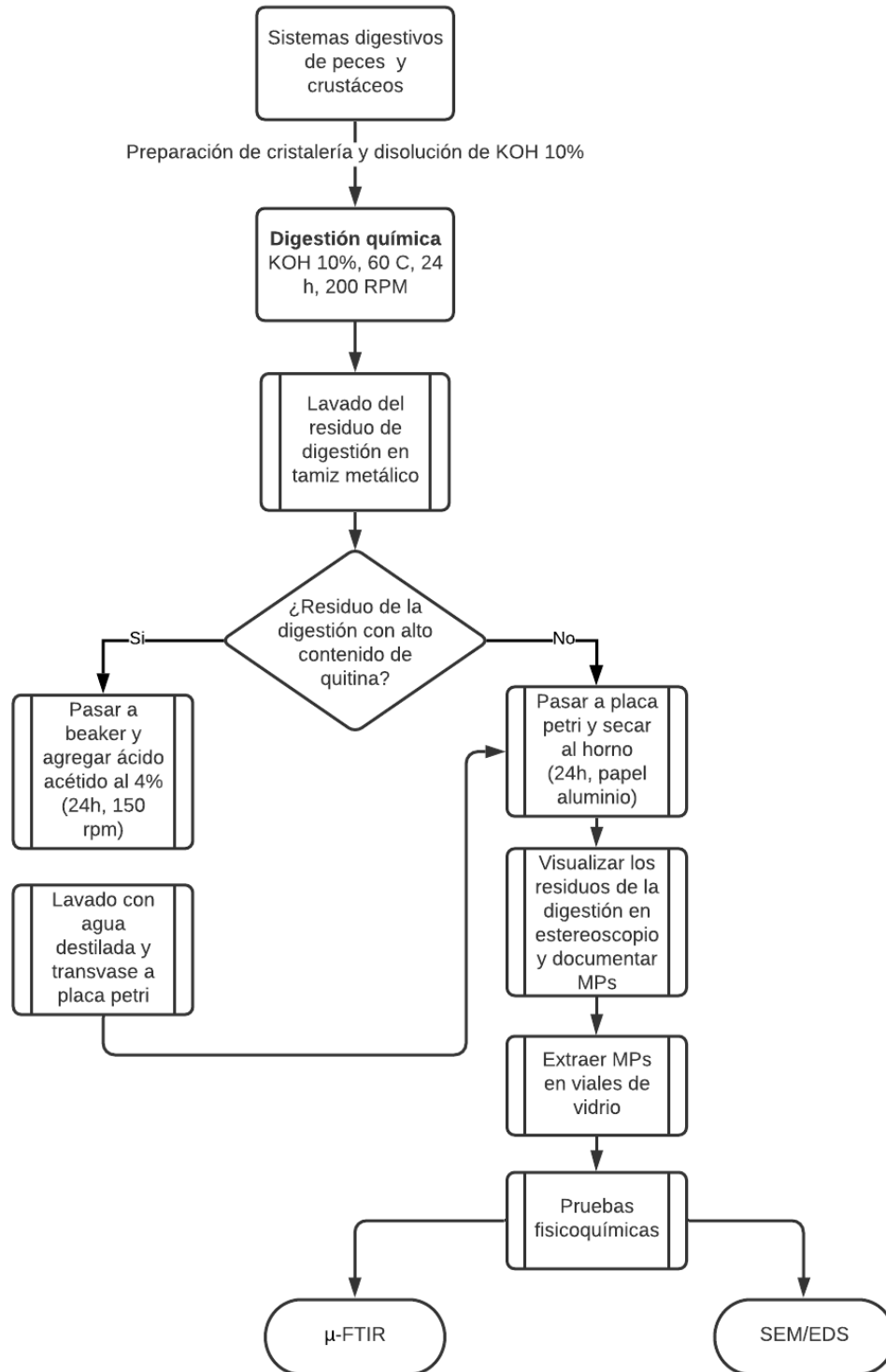
**Figura A 1.22** Residuos de la digestión química pre y post tratamiento con ácido acético al 5% en la muestra C5



**Figura A 1.23** Residuos de la digestión química pre y post tratamiento con ácido acético al 5% en la muestra F23



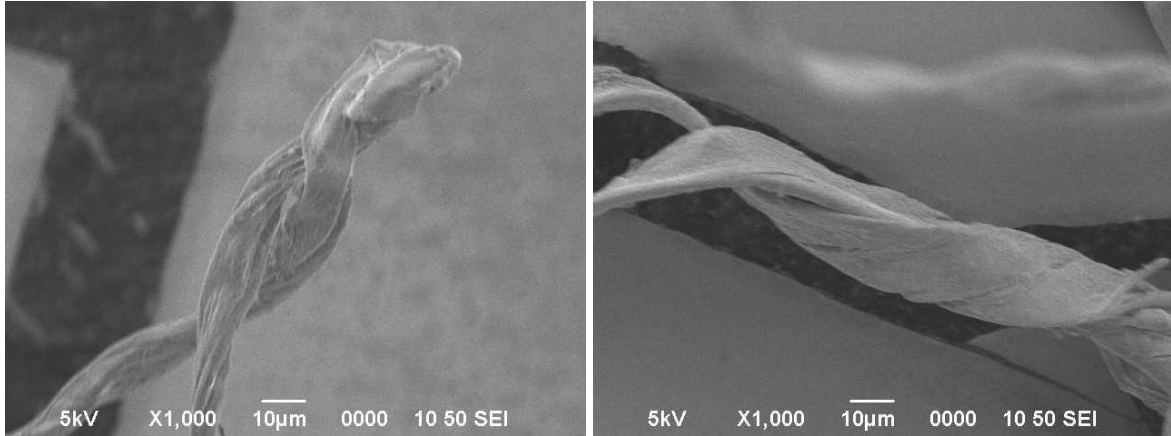
**Figura A 1.24** Residuos de la digestión química pre y post tratamiento con ácido acético al 5% en la muestra F16



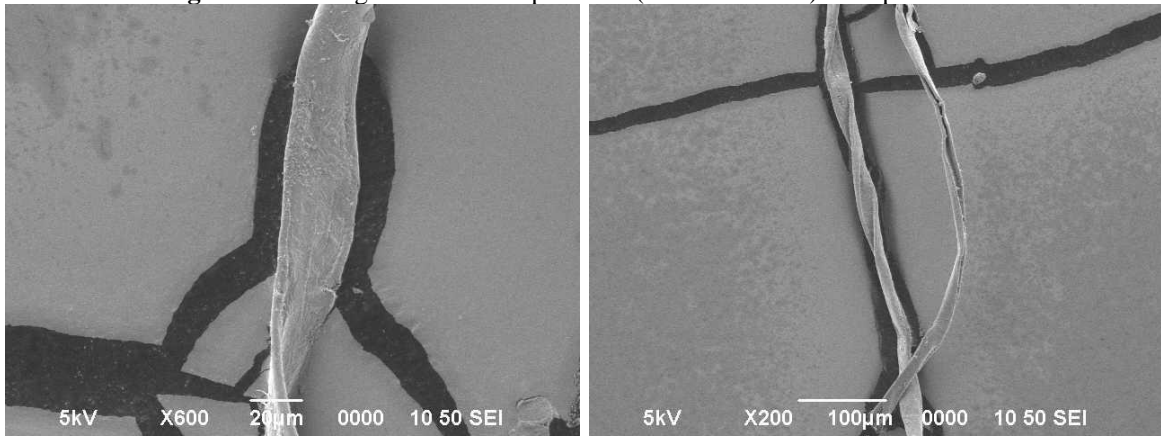
**Figura A.1.25** Metodología recomendada para la determinación de MPs en especies marinas de alto nivel trófico



## 8.2 APÉNDICE 2: IDENTIFICACIÓN DE LAS PARTÍCULAS EXTRAÍDAS



**Figura A.2.1** Imágenes obtenidas por SEM (aumento x1000) de la pieza F23.1

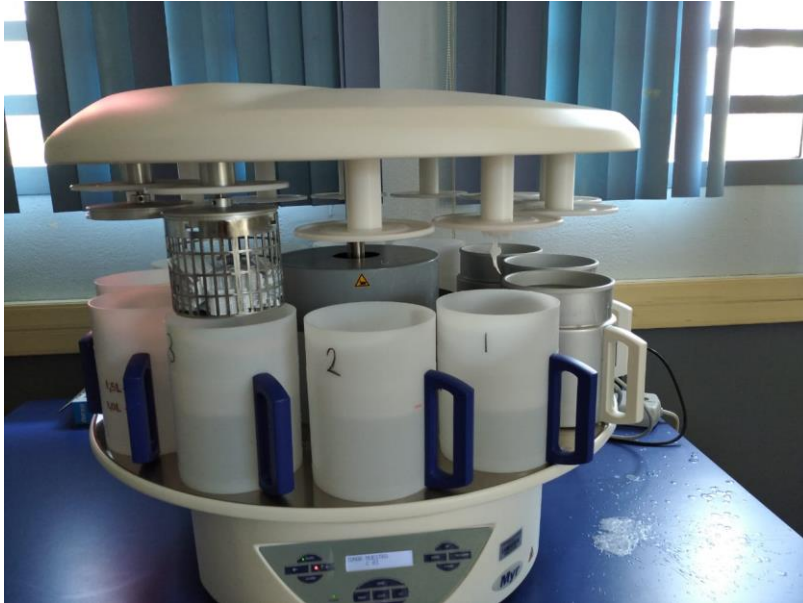


**Figura A.2.2** Imágenes obtenidas por SEM de la pieza F23.2

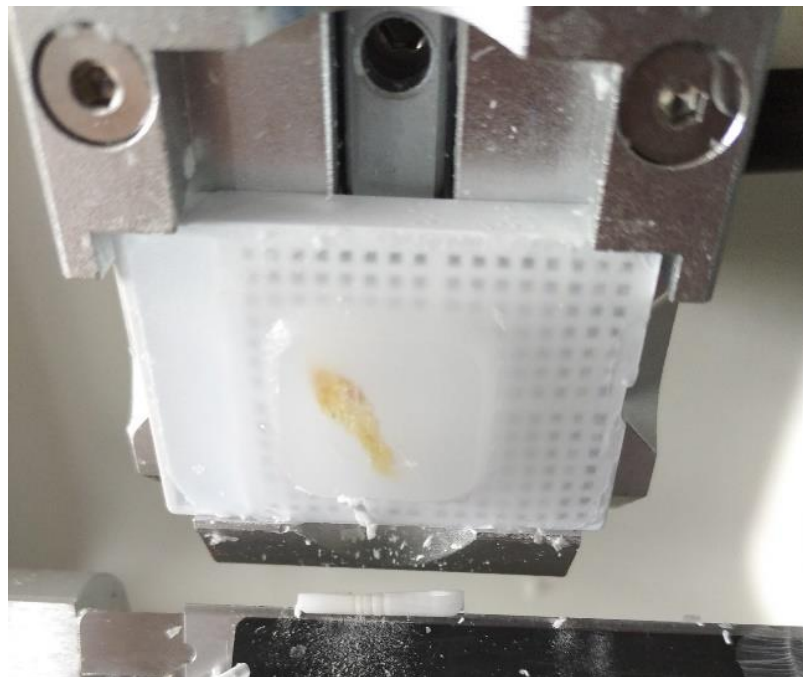
**Cuadro A.2.1.** Resultados obtenidos por EDS

Código de muestra	Composición elemental másica (%)				Total
	Carbono	Oxígeno	Otro	Oro	
F23.1.1	14.3	5.9	0	79.8	100
F23.1.2	45.4	24.0	0	30.6	100
F23.1.3	60.6	18.8	0	20.6	100
F23.1.4	57.8	20.7	0	21.5	100
F23.1.5	43.0	15.3	0	41.7	100
F23.1.6	59.4	19.8	0	20.8	100
F23.2.1	65.9	20.5	0	13.7	100
F23.2.2	68.8	21.5	0	9.7	100
F23.3.1	73.7	13.2	0	12.1	99
F23.3.2	73.3	12.7	0	14.1	100
F23.4	34.3	24.6	7.3	33.8	100

### 8.3 APÉNDICE 3: PROCESO DE HISTOLOGÍA



**Figura A.3.1** Procesador de tejidos MYR-ST-120



**Figura A.3.2** Corte en el microtomo



**Figura A.3.3** Cámara de tinción

## 8.4 APÉNDICE 4: PRUEBAS ESTADÍSTICAS REALIZADAS

### Estadísticos descriptivos: Peces y Jaibas

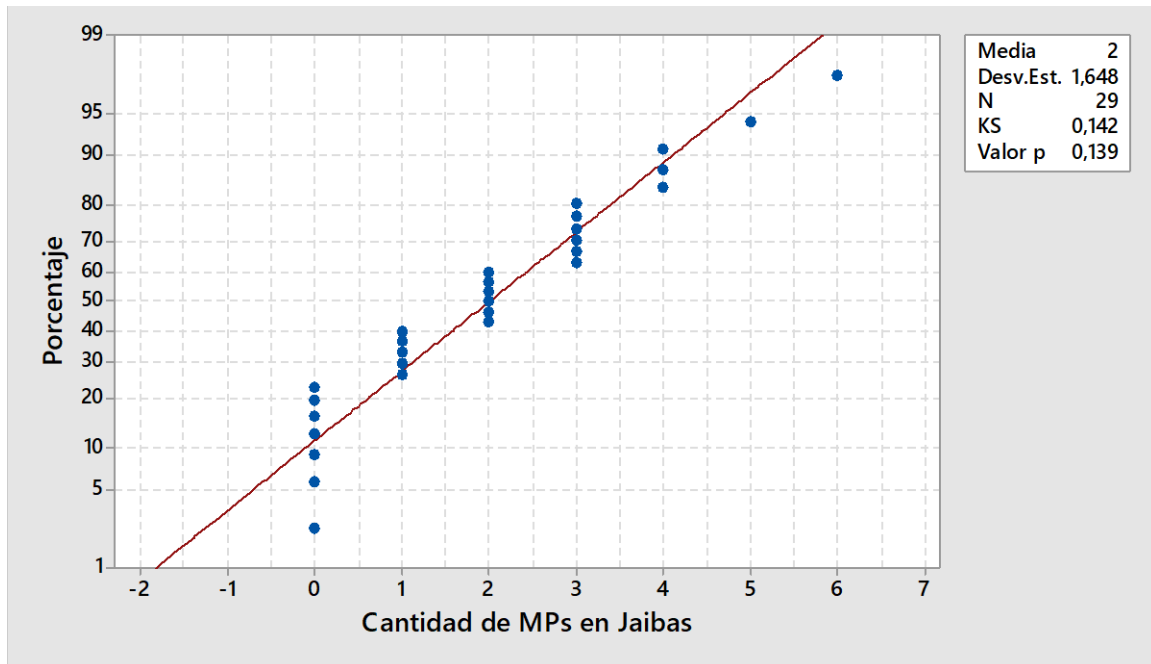
Variable	N	Media	Desv. Est	Varianza	Q <sub>1</sub>	Mediana	Q <sub>3</sub>	Mínimo	Máximo
Peces	27	3.333	2.000	4.000	2.000	3.000	5.000	0.000	7.000
Jaibas	29	2.000	1.648	2.714	0.500	2.000	3.000	0.000	6.000

Se desea analizar la ocurrencia de MPs y la tendencia central de cantidad de MPs por individuo.

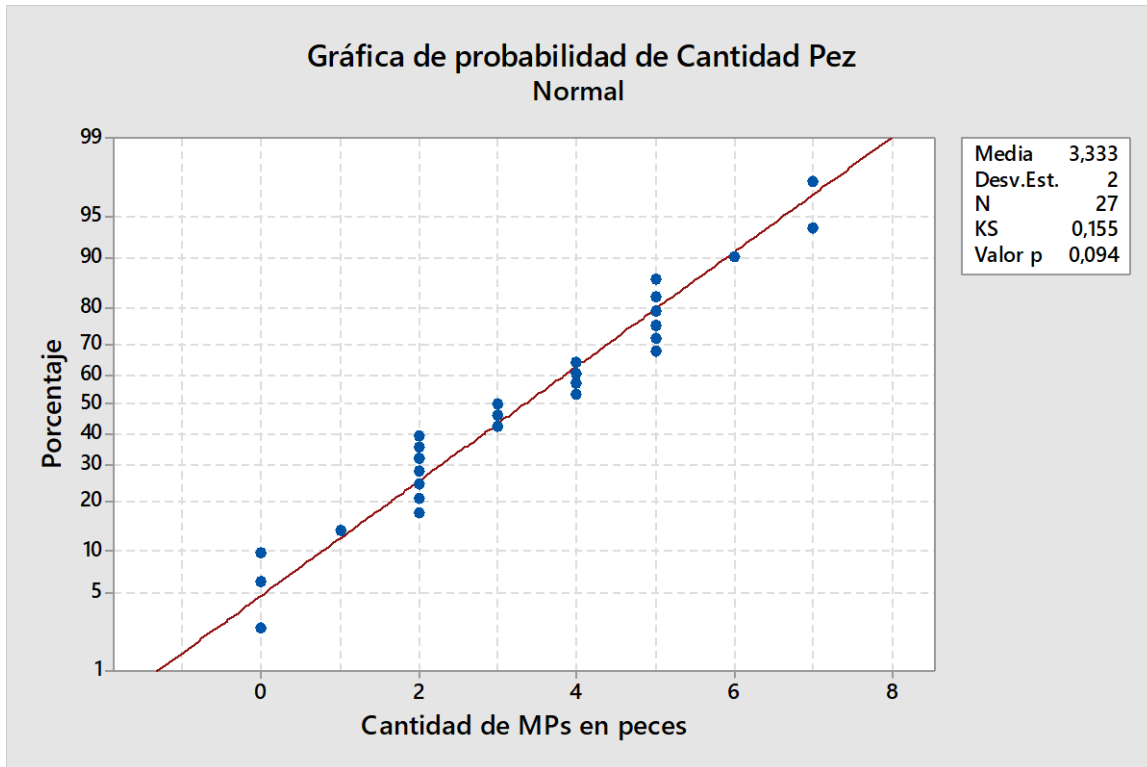
Primero se verifica la normalidad mediante la Prueba Shapiro al 95% de confianza. En donde;

H<sub>0</sub>: Los datos siguen una distribución normal

H<sub>1</sub>: Los datos no siguen una distribución normal



**Figura A.4.1** Gráfica de probabilidad de normalidad de la cantidad de MPs en jaibas



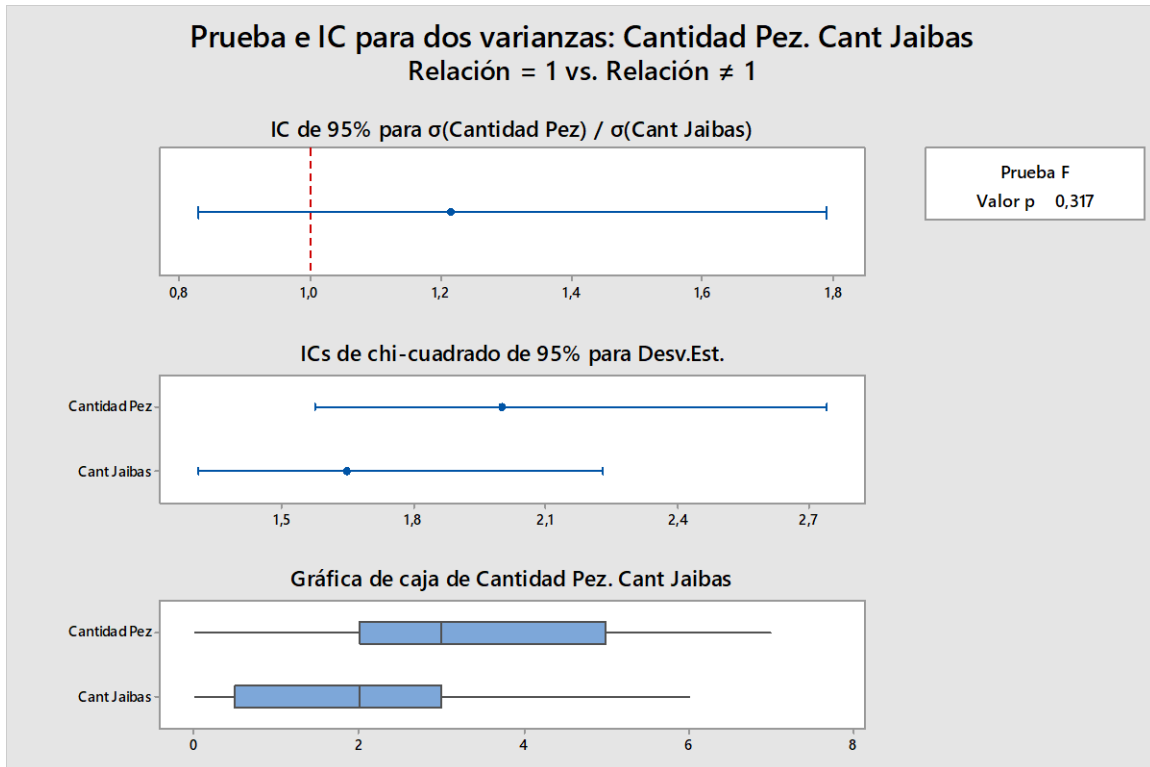
**Figura A.4.2** Gráfica de probabilidad de normalidad de la cantidad de MPs en peces

Em ambos casos el valor  $p > 0.05$ , por lo tanto, se acepta la  $H_0$ , se asegura con un 95 de confianza que los datos de ambas variables siguen una distribución normal.

Seguidamente se calcula el estadístico F al 95% de confianza para determinar si hay diferencia entre las varianzas entre la cantidad de MPs en los peces y en las jaibas.

$H_0$ : las varianzas son iguales

$H_1$ : varianzas no son iguales.



**Figura A.4.2** Gráfica de prueba de varianzas entre la cantidad de MPs en peces y jaibas

El valor p es mayor que el nivel  $\alpha$ , se acepta la hipótesis nula de que las varianzas son iguales.

**Prueba 1: T de dos muestras para la cantidad de MPs en peces y en jaibas**

$H_0$ : No hay diferencia significativa entre la media de MPs/pez y MPs/jaiba.

$H_1$ : Hay diferencia significativa entre la media de MPs/pez y MPs/jaiba.

Prueba T de dos muestras: Peces, Jaibas: Bilateral

Variable	N	Media	Desv. Estándar	Error estándar de la media
Peces	27	3.333	2.00	0.38
Jaibas	29	2.000	1.65	0.31

Diferencia =  $\mu$  (Cantidad MP Peces) -  $\mu$  (Cantidad MP Jaibas)

Estimación de la diferencia: 1,333

IC de 95% para la diferencia: (0,354. 2,312)

Prueba T de diferencia = 0 (vs.  $\neq$ ): Valor T = 2,73 Valor p = 0,009 GL = 54

Ambos utilizan Desv.Est. agrupada = 1,8257

**Resultado:** Valor  $p < 0.05$ , por lo tanto, se acepta la hipótesis alternativa. Se asegura a un 95% de confianza que hay una diferencia significativa entre la cantidad de MPs/pez y MPs/jaiba.

Se vuelve a analizar si hay una diferencia entre la cantidad de MPs/individuo, pero a una cola para determinar si el valor obtenido en peces es mayor al de las jaibas.

$H_0$ : La media de MPs/pez no es significativamente mayor a la media de MPs/jaiba.

$H_1$ : La media de MPs/pez es significativamente mayor a la media de MPs/jaiba.

Prueba T de dos muestras: Peces, Jaibas: 1 cola

Diferencia =  $\mu$  (Cantidad Pez) -  $\mu$  (Cant Jaibas)

Estimación de la diferencia: 1,333

Límite inferior 95% de la diferencia: 0,516

Prueba T de diferencia = 0 (vs. >): Valor T = 2,73 Valor p = 0,004 GL = 54

Ambos utilizan Desv.Est. agrupada = 1,8257

**Respuesta:** Valor  $p < 0.05$ , por lo tanto, se acepta la hipótesis alternativa. Se asegura con un 95% de confianza que la cantidad de MPs/pez es significativamente mayor al valor de MPs/jaiba.

## **Prueba 2: Ocurrencia de MPs en los organismos demersales y bentónicos**

Se realiza una prueba de dos proporciones para determinar si hay diferencia significativa entre la ocurrencia de ingesta de MPs en ambos tipos de organismos.

$H_0$ : No hay diferencia significativa entre la ocurrencia de MPs en los peces y MPs en las jaibas.

$H_1$ : Hay diferencia significativa entre la ocurrencia de MPs en los peces y MPs en las jaibas.

Prueba de IC para dos proporciones

Muestra	X	N	Muestra p
1	24	27	0.888889
2	22	29	0.758621

Diferencia =  $p(1) - p(2)$

Estimación de la diferencia: 0.130268

IC de 95% para la diferencia: (-0.0654566, 0.325993)

Prueba para la diferencia = 0 vs.  $\neq 0$ :  $Z = 1.27$  Valor  $p = 0.203$

\* NOTA \* La aproximación normal puede ser inexacta para muestras pequeñas.

**Respuesta:** Valor  $p > 0.05$ , por lo tanto, se acepta la hipótesis nula. Se asegura con un 95% de confianza que no hay diferencia significativa en la ocurrencia de MPs en peces demersales y crustáceos bentónicos.