UNIVERSIDAD POLITÉCNICA SALESIANA SEDE CUENCA

CARRERA DE INGENIERÍA EN BIOTECNOLOGÍA DE LOS RECURSOS NATURALES

Trabajo de titulación previo a la obtención del título de Ingeniera en Biotecnología de los Recursos Naturales

TRABAJO EXPERIMENTAL:

"EVALUACIÓN DE LA PRESENCIA DE MICROPLÁSTICOS EN AGUA EMBOTELLADA EN LA REGIONAL 6"

AUTORAS:

JENNIFFER ELIANA FLORES CALLE

KAREN GABRIELA OROZCO GUALOTO

TUTOR:

ING. PABLO WILSON ARÉVALO MOSCOSO, Ph. D

CUENCA - ECUADOR

2022

CESIÓN DE DERECHOS DE AUTOR

Nosotras, Jenniffer Eliana Flores Calle con documento de identificación N°

0107103541 y Karen Gabriela Orozco Gualoto con documento de identificación N°

0302530498, manifestamos nuestra voluntad y cedemos a la Universidad Politécnica

Salesiana la titularidad sobre los derechos patrimoniales en virtud de que somos autoras

del trabajo de titulación: "EVALUACIÓN DE LA PRESENCIA DE

MICROPLÁSTICOS EN AGUA EMBOTELLADA EN LA REGIONAL 6",

mismo que ha sido desarrollado para optar por el título de: Ingeniera en

Biotecnología de los Recursos Naturales, en la Universidad Politécnica Salesiana,

quedando la Universidad facultada para ejercer plenamente los derechos cedidos

anteriormente.

En aplicación a lo determinado en la Ley de Propiedad Intelectual, en nuestra condición

de autoras nos reservamos los derechos morales de la obra antes citada. En

concordancia, suscribimos este documento en el momento que hacemos la entrega del

trabajo final en formato digital a la Biblioteca de la Universidad Politécnica Salesiana.

Cuenca, enero de 2022.

Jenniffer Eliana Flores Calle

C.I. 0107103541

Karen Gabriela Orozco Gualoto

C.I. 0302530498

ii

CERTIFICACIÓN

Yo, declaro que bajo mi tutoría fue desarrollado el trabajo de titulación: "EVALUACIÓN DE LA PRESENCIA DE MICROPLÁSTICOS EN AGUA EMBOTELLADA EN LA REGIONAL 6", realizado por Jenniffer Eliana Flores Calle y Karen Gabriela Orozco Gualoto obteniendo el *Trabajo Experimental*, que cumple con todos los requisitos estipulados por la Universidad Politécnica Salesiana.

Cuenca, enero de 2022.

Ing. Pablo Wilson Arévalo Moscoso, Ph.D

C.I. 0102156957

DECLARATORIA DE RESPONSABILIDAD

Nosotras, Jenniffer Eliana Flores Calle con documento de identificación N° 0107103541 y Karen Gabriela Orozco Gualoto con documento de identificación N° 0302530498, autoras del trabajo de titulación: "EVALUACIÓN DE LA PRESENCIA DE MICROPLÁSTICOS EN AGUA EMBOTELLADA EN LA REGIONAL 6", certificamos que el total contenido del *Trabajo Experimental*, es de nuestra exclusiva responsabilidad y autoría.

Cuenca, enero de 2022.

Jenniffer Eliana Flores Calle

C.I. 0107103541

Karen Gabriela Orozco Gualoto

C.I. 0302530498

AGRADECIMIENTO

Primeramente, agradecer a Dios por darme las fuerzas necesarias para seguir con mucha perseverancia y así culminar esta etapa.

A mi madre Graciela que desde un inicio me apoyó y aunque no esté presente físicamente sé que estaría muy orgullosa por mis logros realizados.

A mi esposo Pedro por creer en mí, por su ayuda tanto moral y económicamente y por su amor incondicional que me ayudaron a culminar mi carrera universitaria.

A mi hija Renata quien también fue el motor para seguir luchando constantemente.

A mis tías Julia y Elena que también me apoyaron mucho para no rendirme.

A mi compañera de tesis por su paciencia, apoyo emocional y por brindarme su amistad.

Jenniffer Eliana Flores Calle

AGRADECIMIENTOS

A los docentes por transmitirnos sus conocimientos, en especial a nuestro tutor Dr. Pablo Arévalo por su disponibilidad en todo el transcurso del desarrollo de la tesis, a la Dra. Inés Malo por su calidad de persona y al Ing.

Jhison Romero por sus enseñanzas.

A la Universidad Politécnica Salesiana, por permitirnos crecer de manera profesional y poder culminar de manera exitosa.

AGRADECIMIENTO

Primero agradezco a Dios por guiarme, acompañarme y ayudarme a seguir adelante en todo este transcurso educativo y permitirme culminar mi carrera con éxito.

A mis Padres Edgar y Lucía quienes con su amor, paciencia y esfuerzo me han permitido llegar a cumplir hoy una de mis metas. Gracias por su apoyo constante en cada etapa de mi vida.

A mis hermanos Talía, Ronald y Stalin, quienes día a día con su presencia, respaldo y amor me han impulsado para salir adelante.

A toda mi familia y amigo/as, quienes con su cariño y consejos hicieron de mí una mejor persona, demostrándome su apoyo incondicional.

A Jenniffer mi compañera de tesis por brindarme su amistad y apoyo en momentos difíciles.

Karen Gabriela Orozco Gualoto.

DEDICATORIA

Dedicado a mi madre que está en el cielo, esposo e hija

Jenniffer Eliana Flores Calle

DEDICATORIA

El presente trabajo de investigación va dedicado de manera especial a Dios por mostrarme su amor infinito, por guiarme en todo momento y por brindarme cada día la sabiduría necesaria para poder culminar con mis estudios.

A mis padres Edgar y Lucía por el apoyo incondicional que me han brindado durante toda mi formación académica.

A mis hermanos Talía, Ronald y Stalin, a los que amo infinitamente y han sido motivación para logar cada uno de mis sueños.

Finalmente quiero dedicar esta tesis a mi abuelita quien fue un ejemplo de vida y que cuida de mí desde la eternidad.

Karen Gabriela Orozco Gualoto.

INDICE DE CONTENIDOS

2.1.15.	Policloruro de vinilo	9
2.1.16.	Polipropileno	9
2.1.17.	Poliestireno	9
2.1.18.	Fluorocromos	10
2.1.19.	Espectro	10
2.1.20.	Distribución de tamaño	10
2.2 ESTA	DO DEL ARTE	10
2.3 BASE	S TEÓRICAS	14
2.3.1 M	étodos de extracción para microplásticos	14
2.3.2 M	icrofiltración	16
2.3.3 M	étodos de identificación de microplásticos	18
2.3.4. E	spectroscopía	19
2.3.5 Es	spectroscopía infrarroja por transformada de Fourier (FTIR)	21
CAPITULO	3	23
METODOLO	OGÍA	23
3.1 NIVE	L DE INVESTIGACIÓN	23
3.2 DISEÑ	ŇO DE LA INVESTIGACIÓN	23
3.3 POBL	ACIÓN Y MUESTRA	23
3.4 VARL	ABLES	24
3.5 TÉCN	ICAS E INSTRUMENTOS DE RECOLECCIÓN DE DATOS	24
3.6. TÉCN	NICAS DE PROCESAMIENTO Y ANÁLISIS DE DATOS	24
3.7 MATE	ERIALES	25
3.8 PROC	EDIMIENTO	26
3.8.1	Fase 1: preparación de la muestra	26
3.8.2	Primera filtración	26
3.8.3	Oxidación	26
3.8.4	Segunda microfiltración al vacío	26
3.8.5	Fase 2: observación y medición en microscopio invertido	27
CAPITULO	4	
ANÁLISIS Y	Y RESULTADOS	28
4.1 Determ	ninación del tamaño de partículas observadas	28

4.2 Caracterización del tipo de microplásticos a través de FTIR	
CAPÍTULO 5	
CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES	
5.1 Conclusiones	38
5.2 Recomendaciones	40
REFERENCIAS	
ANEXOS	47

INDICE DE TABLAS

Tabla 1: Descripcion de los materiales, reactivos y equipos utilizados Tabla 2: Rango de distribución de tamaño de micropartículas encontradas. Tabla 3: Análisis de Varianza de las Marcas de agua embotellada	.30
Tabla 4: Comparación de las muestras de cada marca por el método de	
Tukey	
Tabla 5: Porcentaje de los polímeros encontrados en las diferentes marcas	
agua embotellada	
Tabla 6: Total de partículas encontradas en la marca A.	
Tabla 7: Total de partículas encontradas en la marca B.	.51
Tabla 8: Total de partículas encontradas en la marca C.	. 52
Tabla 9: Total de partículas encontradas en la marca D.	.53
INDICE DE FIGURAS	
Figura 1: Dimensión de una fibra.	
Figura 2: Dimensión de un fragmento.	
Figura 3: Cantidad de micropartículas en la marca "A".	
Figura 4: Cantidad de micropartículas en la marca "B"	
Figura 5: Cantidad de micropartículas en la marca "C"	
Figura 6: Cantidad de micropartículas en la marca "D".	.53
INDICE DE ECUACIÓN	
Ecuación 1: Distribución de tamaño de fragmentos.	. 29

RESUMEN

que ha causado interés a nivel mundial por los riesgos que pueden surgir al ser ingeridos

Por la introducción excesiva de plásticos en la cadena trófica y por ser un tema

en el ser humano, se procedió a realizar la investigación que tiene como objetivo

Evaluar la presencia de microplásticos en agua embotellada en la Regional 6, por tal

motivo se analizaron 72 muestras de cuatro marcas de agua embotellada en donde se

encontraron diversas partículas plásticas (fibras y fragmentos) que posteriormente se

pudo confirmar mediante espectroscopia FTIR. Además, se obtuvo un rango total de

fragmentos de $4.4 \mu m - 248.29 \mu m$ y un rango total de fibras de $102.64 \mu m - 840.20$

um, identificándose así como microplásticos secundarios; sin embargo, al realizar una

comparación de medias con respecto a las fibras y fragmentos encontrados en cada

marca se determinó que la marca B con una media de 233.1 contiene mayor cantidad

de microplástico. Finalmente, con mayor probabilidad de partículas encontradas por el

FTIR fue el polietileno.

PALABRAS CLAVES: microplástico, FTIR, partículas, polietileno.

xiv

ABSTRACT

Due to the excessive introduction of plastics into the trophic chain and

because it is a topic that has caused worldwide interest due to the risks that can arise

when ingested by humans, we proceeded to conduct the research aimed at evaluating

the presence of microplastics in bottled water in Regional 6. For this reason, 72 samples

of four brands of bottled water were analyzed, where various plastic particles (fibers

and fragments) were found, which were later confirmed by FTIR spectroscopy. In

addition, a total range of fragments of 4.4µm - 248.29µm and a total range of fibers of

102.64 μm - 840.20 μm were obtained, thus identifying them as secondary

microplastics; however, when a comparison of means was made with respect to the

fibers and fragments found in each brand, it was determined that brand B with a mean

of 233.1 contains a greater amount of microplastics. Finally, with the highest

probability of particles found by FTIR was polyethylene.

KEYWORDS: MICROPLASTIC, FTIR, PARTICLES, POLYETHYLENE.

XV

CAPITULO 1

INTRODUCCIÓN

Durante los últimos años los plásticos se han introducido de forma agresiva a la cadena trófica afectando el ciclo de vida de los seres humanos al igual que nuestro ecosistema, actualmente los materiales plásticos han alcanzado una demanda a nivel mundial debido a sus propiedades físico químicas combinadas con los bajos costos de fabricación, lo que hacen que este material sea casi irremplazable en la producción de bienes domésticos e industrial.

Los microplásticos son un conjunto heterogéneo de partículas sólidas que generalmente varían de 20 µm a 5 mm de diámetro que se acumulan en el ambiente, estos pueden ser primarios o secundarios. Los primarios van desde 5 mm a 1 mm, siendo esta materia prima utilizada en la fabricación de pellets industriales como también productos de cuidado personal. En cuanto a los micro plásticos secundarios va desde 1 mm a 20 µm, los mismos que se producen por la fragmentación del plástico ya sea por acción foto o termo oxidativa y la acción mecánica (SAPEA, 2019).

Es por eso que muchos microplásticos surgen de la descomposición de plásticos voluminosos como el polietileno de bolsas y botellas, poliestireno de recipientes para alimentos, nailon, polipropileno de las telas, cloruro de polivinilo de las tuberías, o, las esferas pequeñas (Sarria & Gallo, 2016).

El interés por el microplástico en el agua del grifo y agua embotellada fue iniciado en el año 2018 por Kosuth, Mason y Wattenberg, donde percibieron que su riesgo se halla en la facultad de transportar sustancias tóxicas empleadas en la industria plástica. Por esta razón este tema de investigación tiene como propósito aumentar la comprensión sobre microplásticos en agua embotellada influyendo así conocimientos actuales y necesidades de investigación debido al alto interés por su contaminación.

1.1 PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA DE INVESTIGACIÓN

Hoy en día existen muchas fuentes de contaminación ambiental y varios vectores que permiten su influencia en la especie humana, una de estas fuentes de contaminación ambiental son los residuos plásticos, los mismos que no se limitan solo a la degradación de estos en el medio sino a la desintegración en partículas más pequeñas. Es por eso que los contaminantes aumentan el riesgo de ser ingeridos de forma desmedida conforme avanza el desarrollo del hombre (Chávez Carrillo, 2019).

Los microplásticos tienen gran prevalencia en océanos y hábitats continentales, por lo que los diversos contaminantes creados a partir de los plásticos constituyen un nuevo entorno de estudio. Estos están directamente relacionados con la fabricación, consumo, disposición inadecuada, descomposición y posterior lixiviación de contaminantes químicos de elementos como pellets y bolsas plásticas, siendo una fuente importante de preocupación para el medio ambiente y la salud humana en todas las escalas (O 'Sullivan, 2014).

La presencia de microplásticos en fuentes de agua han alcanzado la cadena alimenticia humana, contaminando así a los animales marinos y otros productos tales como el azúcar, sal, cerveza, leche, y con mayor preocupación las fuentes de agua para el consumo humano (Koelmans et al., 2019).

Estas partículas microscópicas de plástico pueden operar como vectores de enfermedades, interactuando con animales terrestres e influyendo en su salud y funcionamiento del suelo. Las partículas de plástico, en general, adquieren nuevas propiedades físicas y químicas a medida que se degradan, haciéndolas dañinas para el organismo. Los vectores que pueden ocasionar este efecto toxico son: el bisfenol A, plastificantes como el ftalato de diisononilo y ftalato de diisodecilo, además de los retardantes de llama como polibromomodifeniléteres, hexabromociclodecano, estabilizantes como octoato de zinc, estearatos, carboxilatos, metales pesados como por

ejemplo zinc, cadmio, estaño, plomo y otros, que al ser ingeridos pueden ocasionar daños en el organismo (Beltrán & Marcilla, 2012).

El agua al ser un líquido vital se le considera como un producto de interés dentro de la investigación, ya que al encontrarse con microplásticos puede presentar en la salud humana enfermedades o efectos tóxicos en el transcurso del tiempo, de acuerdo con las razones antes mencionadas y con el propósito que en un futuro los resultados obtenidos concienticen los problemas de contaminación por el uso indiscriminado del plásticos, se plantea el estudio "Evaluar la presencia de microplásticos en agua embotellada en la Regional 6 mediante un proceso de microfiltración para su observación a través del microscopio invertido".

1.2 PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN

¿Existe la presencia de microplásticos en las diferentes marcas de agua embotellada en la Regional 6?

1.3 JUSTIFICACIÓN

En la actualidad es imposible no encontrarse con micropartículas de plástico, debido a que en su mayoría se generan por el resultado de las actividades del ser humano, al mismo tiempo no existe suficiente información y por ello la población no toma conciencia acerca de la presencia de estas partículas en los alimentos.

Según Sierra y colaboradores, (2020), los efectos de la ingestión de microplásticos en humanos aún no se han determinado; sin embargo, se sabe que los microplásticos son capaces de adsorber, acumular y transportar diversas sustancias químicas, y que la biota expuesta a ellos puede consumirlos, provocando que ingresen a la cadena alimentaria y provoquen efectos adversos. Por otro lado, se requieren métodos analíticos para identificar, caracterizar y determinar la existencia de microplásticos en los ecosistemas.

Desde el punto de vista ambiental y social es importante conocer aquellas fuentes de contaminación por microplásticos y así no dejar a la población en el desconocimiento del tema y de los posibles efectos a largo plazo en cuanto a la salud.

1.4 LIMITACIONES

Las limitantes que se presentaron en la investigación son desde el punto de vista tecnológico ya que no se dispone de microscopía de infrarrojo que facilitaría el proceso investigativo. Aunque el laboratorio cuenta con un microscopio de fluorescencia, este lamentablemente no dispone de los insumos necesarios para el mismo.

OBJETIVOS

1.6.1 Objetivo general

Evaluar la presencia de microplásticos en agua embotellada en la Regional 6 mediante un proceso de microfiltración para su observación a través del microscopio invertido.

1.6.2 Objetivos específicos

- Determinar el tamaño de partículas observadas en las muestras de agua embotellada a través del microscopio invertido para establecer la dimensión.
- Caracterizar el tipo de micro plástico presente en las muestras de agua embotellada a través de espectroscopía FTIR para su clasificación.
- Elaborar una propuesta de artículo científico respetando los formatos internacionales para la posible divulgación de los resultados obtenidos.

1.5 HIPÓTESIS

Existe presencia de microplásticos en las diferentes marcas de agua embotellada analizadas en la Regional 6.

CAPITULO 2

MARCO TEORICO

2.1 MARCO CONCEPTUAL

2.1.1. Plásticos

Son polímeros derivados del petróleo. Se producen mediante la unión de miles monómeros que a su vez forman diferentes cadenas. Estos se caracterizan por su resistencia/densidad, por sus propiedades para el adecuado aislamiento térmico y eléctrico, al igual son resistentes a los ácidos, álcalis y disolventes (Díaz, 2015).

2.1.2. Macroplásticos

Los macroplásticos son provocados por las múltiples ocupaciones diarias de las personas, se encuentran en forma de residuos con un diámetro superior a los 25 mm. Su efecto en el ecosistema contamina el ambiente de una manera acelerada.

2.1.3. Microplásticos

Cualquier partícula sintética o matriz polimérica derivadas del petróleo o de base biológica de forma regular o irregular que oscila entre 1 µm y 5 mm, que pueden ser de origen primario o secundario que a su vez son insolubles en agua (SAPEA, 2019).

2.1.4. Microplásticos secundarios

Plásticos que se forman durante la degradación de los mismos u otros materiales como fibras, fragmentos de plástico, etc (Rivera et al., 2020).

2.1.5. Microplásticos primarios

Plásticos fabricados en un rango menor a 5 mm como pellets de plástico y depuradores (Rivera et al., 2020).

2.1.6. Fibras plásticas

Las fibras plásticas son aquellas que tienen una longitud variable y un grosor de pocas micras, pero son consideradas micropartículas plásticas.

2.1.7. Fragmentos plásticos

Los fragmentos plásticos son aquellos que tienen una longitud y grosor variable.

2.1.8. Resinas termoplásticas

Son aquellas que pueden reutilizarse algunas veces sin originar un cambio en su composición química.

2.1.9. Resinas termofijas

No pueden ser reprocesadas debido a que se produciría un cambio en su composición química.

2.1.10. Elastómeros

Polímeros naturales o sintéticos que tienen la capacidad de experimentar varias deformaciones elásticas a temperatura ambiente (Díaz, 2015).

2.1.11. Polímero termoplástico

Material que a temperaturas muy altas puede volverse deforme o flexible.

2.1.12. Polietileno

Polímero más común en los plásticos debido a su bajo precio y facilidad en su fabricación.

2.1.13. Polietileno de alta densidad

Polímero termoplástico formado por unidades de etileno con alta resistencia química y térmica, siendo así flexible y ligero.

2.1.14. Polietileno de baja densidad

Polímero termoplástico formado por unidades de etileno, resistente a los impactos y con mayor flexibilidad que al polietileno de alta densidad.

2.1.15. Policloruro de vinilo

Plástico versátil formado por la combinación de cloro y carbono con alta resistencia ambiental y de baja densidad.

2.1.16. Polipropileno

Polímero termoplástico obtenido por la polimerización del propileno.

Resistente a agentes químicos.

2.1.17. Poliestireno

Polímero termoplástico que se obtiene por la polimerización del estireno. Puede reciclarse en viguetas de plástico, cajas de cintas para casetes y macetas.

2.1.18. Fluorocromos

Sustancias que emiten un fotón de una longitud de onda determinada cuando captan, son excitados, por un fotón incidente de una longitud de onda característica (Pucciarelli, 2009)

2.1.19. Espectro

Representación gráfica de la distribución de intensidades de una radiación en función de la longitud de onda emitida.

2.1.20. Distribución de tamaño

Determina el promedio del tamaño de partículas, fragmentos y fibras, debido a su dispersión o morfología irregular.

2.2 ESTADO DEL ARTE

En la investigación publicada por la revista The Royal Society of Chemistry denominada "Raman microspectroscopic analysis of fibers in beverages" se analizó tres litros de agua mineral embotellada mediante espectroscopia micro-Raman en el cual se encontró fibras sintéticas con un rango de tamaño entre 1 µm y 5 mm. Los autores afirmaron que dicha contaminación por fibras se deriva probablemente por la contaminación del aire y no específicamente del agua mineral (Wiesheu et al., 2016).

En el estudio realizado por Mason y colaboradores en el año 2018 denominado "Synthetic Polymer Contamination in Bottled Water", investigaron microplásticos en once marcas de agua embotellada de origen mundial, utilizando Rojo Nilo para la identificación de partículas menores a 100 µm. El 93% de agua embotellada analizada

mostró contaminación por microplásticos en un promedio de 10.4 partículas mayores a 100 µm por litro de agua que posteriormente fue confirmado por análisis espectroscópico FTIR (Mason et al., 2018).

BBC Mundo realizó un estudio en 2017 llamado "¿Cuánto microplástico contiene el agua que bebes?", dando a conocer que han descubierto fibras de plástico en el agua del grifo utilizada para beber. En los cinco continentes, se analizaron 159 muestras de varios países, encontrando microplásticos en el 83% de ellas. El país con la tasa más alta (94%) es Estados Unidos, seguido por Líbano (93,8 %) e India (82,4 %). Las muestras incluyen índices para Ecuador (79,2%), Europa (72,2%) y otros países (Mundo, 2017).

En la investigación "Anthropogenic contamination of tap water, beer, and sea salt" analizaron la presencia de microplásticos en 159 muestras de agua del grifo de origen mundial, encontrando partículas plásticas en el 81% de las muestras que en su mayoría eran fibras (Kosuth et al., 2018)

En un estudio realizado en el año 2020 por Shruti y colaboradores "Metro station free drinking water fountain-A potential microplastics hotspot for human consumption" analizaron 42 fuentes de agua potable de la estación del metro de la ciudad de México, detectando microplástico en todas las muestras con un promedio de 18 ± 7 partículas por litro (Shruti et al., 2020).

En la publicación "Human Consumption of Microplastics" utilizaron 402 datos de 26 estudios realizados donde concluyen que la población estadounidense al consumir agua embotellada puede ingerir 90000 micropartículas anualmente, mientras

que al consumir agua del grifo ingieren 4000 micropartículas. Se ha demostrado que los niveles de microplástico en el agua embotellada son mayores que en el agua del grifo (Cox et al., 2019).

Además, Oßmann, Sarau, Holtmannspötter, Pischetsrieder, Christiansen y Dicke (2018) en su investigación desarrollada "Small-sized microplastics and pigmented particles in bottled mineral water" en Alemania con respecto a la cuantificación de microplásticos en agua embotellada identificaron partículas plásticas de 118 ± 88 partículas por litro en envases retornables plásticos, mientras que en las botellas de plástico de un solo uso se encontró aproximadamente 14 ± 14 partículas por litro con tamaños de partícula que oscilaban entre 1.5 y $100~\mu m$ (Oßmann et al., 2018).

Mediante un estudio realizado por Zhou, Wang, Li, Zhang, Jiang, y Dong Lei Zhang titulada como "Microplastic pollution of bottled water in China" realizaron estudios de la presencia de microplástico mayores a 25 μm en 23 marcas de agua embotellada en la ciudad de China, utilizando imágenes de espectroscopia infrarroja por transformada de Fourier identificando dos formas, fibras y fragmentos, y 11 tipos de microplástico con tamaños de 0.25 – 5.000 mm y con concentraciones entre 2 partículas/botella y 23 partículas/botella. Concluyeron que esta contaminación por microplásticos puede proceder de la fuente de agua cruda y del envase.

En el artículo científico "La gran problemática ambiental de los residuos plásticos: Microplásticos", publicado el 28 de mayo del 2016 por Sarria y Gallo, menciona que desde que se inventó el plástico, este ha dado muchos beneficios a la humanidad, pero a su vez hace referencia que estas pequeñas partículas de plástico se

van acumulando poco a poco en el medio ambiente llegando así a las aguas residuales (Sarria & Gallo, 2016).

Pazos, R. y colaboradores (2017) en su estudio" Microplastics in gut contents of coastak freshwater fish from Río de la Plata estuary ", determinaron que los peces costeros de agua dulce del Río de la Plata están contaminados con microplásticos, los cuales fueron extraídos de diferentes especies con distintos hábitos alimenticios, dando como respuesta que el 100 % de los peces tengan microplásticos en su tracto estomacal, por consiguiente este estudio indica que la contaminación por microplásticos presentes en ríos y mares está provocando su consumo por las especies marinas. Además, se pudo notar que aquellos peces que se encontraban cerca de las aguas residuales presentaron mayor cantidad de microplástico en su contenido estomacal.

En el artículo científico "Tissue accumulation of microplastics in mice and biomarker responses suggest widespread health risks of exposure", publicado en el año del 2017 por Deng, Zhang, Lemos, y Ren, se les suministró a ratones micropartículas de poliestireno de 5 y 20 micrones a través del agua potable para investigar la toxicidad de los microplásticos. En este experimento se evidenció una inflamación en el hígado, acumulación de gotitas de lípidos, aumento de los marcadores de estrés oxidativo, anomalías en el metabolismo energético y cambios metabólicos; al igual podrían detectarse en secciones histológicas del intestino, riñón e hígado partículas de 5 μm.

Chávez (2019) en su trabajo de investigación "Presencia de microplástico derivado de la degradación de tanques de reserva plásticos en el agua potable de

Riobamba" determinó que el 65.56% de las muestras que han sido tomadas en toda la ciudad de Riobamba tienen presencia de microplástico, mientras que el 34.44% no presentaron partículas plásticas.

Una investigación realizada en la Universidad de las Américas publicada en el año 2018 titulada "Cuantificación de la presencia de microplásticos en la cuenca alta del río Guayllabamba" arrojó resultados de que existe la presencia de 1584.23 microplásticos/m³ desde las cabeceras de los ríos siendo superiores a los registrados en ríos a nivel mundial (Donoso, 2018).

La Universidad Estatal Península de Santa Elena realizó la investigación "Microplástico en el tracto digestivo de *Scomber japonicus, Opisthonema libertate y Auxis thazard*, comercializados en el puerto pesquero de Santa Rosa, provincia de Santa Elena Ecuador", donde se analizaron 540 individuos de las tres especies de pelágicos utilizando NaOH al 10 %, dando como resultado que el 4.07% de los peces analizados presentaron microplástico (Lino, 2020).

2.3 BASES TEÓRICAS

2.3.1 Métodos de extracción para microplásticos

Entre los principales métodos se encuentran los procesos de digestión por reacción enzimática ácida o alcalina.

2.3.1.1 Reacción ácida

Este método es utilizado principalmente por su eficacia al momento de destruir tejidos orgánicos, aislando fibras, pellets o fragmentos de varios organismos. Su

inconveniente es que le proceso de digestión es muy agresivo produciendo así daños a los polímeros en distintos grados.

Los ácidos más empleados para la reacción ácida son:

- Ácido nítrico (HNO₃) al 5%, 35%, 65% o 69%
- Ácido clorhídrico (HCL) al 5%, 37%
- Peróxido de hidrogeno (H₂O₂) al 15%, 30% o 35%

(Lusher et al., 2013)

2.3.1.2 Reacción alcalina

Son reacciones que se realizan mediante hidrólisis de enlaces químicos que a su vez desnaturalizan proteínas de la matriz orgánica, esta metodología es más simple debido a sus cortos periodos de digestión. En comparación con la reacción ácida ésta presenta menor capacidad de degradación por lo cual los polímeros sufren menos daño mediante la digestión alcalina (Miller et al., 2017).

2.3.1.3 Reacción oxidativa

Es utilizada para procesos digestivos de material orgánico, empleado a diferentes concentraciones, 30%,15% o 10%, dependiendo del tipo de material a digerir (Lusher et al., 2013). Según Avio y colaboradores (2015), indica que es una metodología no agresiva en la estructura de los plásticos como el polietileno, poliestireno, polipropileno. Sin embargo, al utilizar esta reacción se puede recuperar gran cantidad de microplásticos.

2.3.1.4 Reacción enzimática

Se emplea en una reacción específica para descomponer los tejidos blandos e hidrolizar las proteínas. Sin embargo, tiene la desventaja de requerir el uso de soluciones homogeneizantes, como el tapón Tris-HCl de 400 mililitros, durante el proceso (Lusher et al., 2013).

2.3.2 Microfiltración

Técnica de separar partículas menores a 10 μm de un fluido, líquido o gas se conoce como microfiltración. Esta técnica puede ser aplicada en procesos como la esterilización en frío de bebidas y productos farmacéuticos, separación de las bacterias del agua, pretratamiento del agua para ultrafiltración, clarificación de zumos, vinos y cerveza, nanofiltración y osmosis inversa, separación de emulsiones de agua y aceite, tratamientos de efluentes, agua de uso médico, agua de laboratorio, o cualquier aplicación de agua de alta pureza (Pineda Santos, 2008).

2.3.2.1 Clasificación de los filtros

Medios filtrantes de superficie: Funcionan según el principio de interceptación directa, lo que significa que las impurezas más pequeñas que el tamaño de los poros pasan a través del filtro. Debido a que hay un efecto menor de la interceptación difusional, el impacto inercial es insignificante (Recasens, 2015).

Entre los medios filtrantes de superficie constan:

- Acetato de celulosa
- Polivinil-difluoruro

- Nailon
- Polisulfona
- Polietersulfona
- Politetra-fluoroetileno

Medios filtrantes de profundidad: Las partículas pueden quedar atrapadas tanto en la superficie como en el grueso del medio filtrante. Como resultado, se incrementará la capacidad de retención de contaminantes.

Entre los medios filtrantes de superficie constan:

- Fibra de vidrio
- Polipropileno
- Acero inoxidable
- Cerámica
- Policarbonato

2.3.2.2 Característica del Filtro de politetrafluoroetileno de 1.0 µm

Según Hawach (2018) los filtros de membrana de politetrafluoroetileno absorben el agua con facilidad y son de alto rendimiento.

Características

- Evita que la humedad pase a través de las salidas de aire
- Su compatibilidad química tiene una mayor o igual resistencia a la de los productos químicos.

- Estériles y no estériles.

Aplicaciones

- Filtración de soluciones agresivas y ácidos fuertes.
- Aplicación en laboratorios para análisis de agua.
- Clarificación de ácidos fuertes y sustancias corrosivas.

2.3.3 Métodos de identificación de microplásticos

2.3.3.1 Microscopia Óptica

La microscopia Óptica se emplea para conocer la microestructura de muestras biológicas e inorgánicas a través de la interacción de haz de luz. Por lo general este método alcanza 1000 aumentos, pero con oculares sofisticados esta cifra puede incrementar al doble (Arraiza et al., 2001).

2.3.3.2 Microscopia electrónica de transmisión (TEM)

Esta técnica microscópica utiliza un conjunto de lentes electromagnéticos y electrostáticos, de modo que un haz de electrones atraviesa una muestra para producir imágenes con una magnificación de hasta 2 millones de veces mejor que un microscopio óptico (Padilha, s. f.).

2.3.3.3 Microscopia electrónica de barrido (SEM)

La microscopia de barrido se utiliza para observar y caracterizar superficialmente materiales orgánicos e inorgánicos, una de las características principales de esta técnica es que trabaja con electrones que a su vez genera una imagen de alta resolución y con una apariencia tridimensional. Al analizar la muestra, ésta debe

ser recubierta con una capa de carbón, o , con una capa delgada de un metal como el oro para darle así propiedades conductoras a la muestra, proporcionando así información de las texturas, formas y composición química de sus constituyentes de manera eficiente y rápida (Ipohorski & Bozzano, 2013).

2.3.3.4 Microscopia de fluorescencia

Es un proceso mediante el cual permite estudiar materiales fluorescentes ya sean estos de manera natural o que han sido tratados con algún material autofluorescente. La muestra absorbe una luz de excitación que posteriormente genera una emisión de luz fluorescente en un tiempo determinado con una longitud de onda adecuada. Además, en esta técnica se requieren de filtros de fluorescencia debido a que estos van a ser los responsables de separar la luz emitida de la luz de excitación (Ghosh et al., 2011).

2.3.4. Espectroscopía

Es una técnica analítica que estudia e interpreta sistemas materiales mediante la radiación electromagnética con la que interaccionan (Sancho, 2012).

2.3.4.1 Técnicas espectroscópicas

2.3.4.1.1 Espectroscopía de absorción atómica

Aplica luz ultravioleta para detectar y cuantificar metales en una muestra. Se produce mediante la medición de concentraciones por detección de absorción radiactiva electromagnética por átomos más que de moléculas (Rodríguez et al., 2016)

2.3.4.1.2 Espectroscopía de UV-Visible

Técnica más común en los laboratorios, consiste en la interacción de la muestra con la radiación ultravioleta. Emplea longitudes de onda comprendida entre los 200 y 400 nm (Kulkarni et al., 2014).

2.3.4.1.3 Espectroscopía de IR (infrarrojo)

Utiliza luz infrarroja para determinar y cuantificar información estructural de ciertas moléculas. La absorción de la radiación IR se basa en el cambio neto del momento dipolar de la molécula como resultado de su movimiento vibracional, emplea longitudes de onda entre los 780 y 2500 nm (Davis & Mauer, 2010).

2.3.4.1.4 Espectroscopía Raman

Esta técnica explora las vibraciones moleculares utilizando una técnica dispersiva basada en el efecto Raman, en la que la frecuencia de una pequeña fracción de radiación dispersa difiere de la frecuencia de radiación incidente monocromática, y se basa en la dispersión inelástica de la radiación incidente a través de interacciones con vibraciones moleculares. Un rayo láser monocromático ilumina las muestras de investigación en espectroscopía Raman, que interactúa con las moléculas de la muestra y produce luz dispersa. Puede abarcar un rango de 4000-10 cm⁻¹, se construye utilizando esta luz, que tiene una frecuencia diferente a la de la luz incidente (Bumbrah & Sharma, 2016).

2.3.4.1.5 Espectroscopía de resonancia magnética nuclear (RMN)

Se basa en la generación de datos para el análisis estadístico de mezclas con el fin de determinar las estructuras tridimensionales para moléculas de interés biológico. Sus principales inconvenientes es la baja sensibilidad en cuanto a la detección y su mayor tiempo de procesamiento (Kovacs et al., 2005).

2.3.5 Espectroscopía infrarroja por transformada de Fourier (FTIR)

Combina la espectroscopia infrarroja por transformada de Fourier con un microscopio óptico, cuando la radiación infrarroja pasa a través de una muestra una parte de ella es absorbida por la muestra y el resto la atraviesa. Requiere poca preparación de la muestra y se puede utilizar para identificar microplásticos directamente en los filtros de la membrana (Recasens, 2015). La región IR del espectro electromagnético se encuentra entre 12800-10 cm⁻¹.

Desde el punto de vista de las aplicaciones se divide en tres zonas:

- IR cercano (NIR): 12800-4000 cm⁻¹
- IR medio: 4000-400 cm⁻¹
- IR lejano: 400-10 cm⁻¹

El IR cercano requiere poca o ninguna preparación de la muestra y produce resultados cuantitativos precisos. Este se asocia con un espectrofotómetro Visible-Ultravioleta y dispositivos de fibra óptica para un análisis remoto, detectando interés en el control de procesos.

En el IR medio se realiza las aplicaciones analíticas tradicionales, una de las ventajas que presenta es su versatilidad, ya que estudia la muestra en cualquier estado que se presente ya sea pastas, líquidos, fibras, películas, polvos, disoluciones, gases o superficies.

El IR lejano solicita el uso de fuentes y materiales ópticos especiales, es utilizado para investigar compuestos inorgánicos, orgánicos u organometálicos que tienen átomos pesados, masa atómica mayor a 19, para proporcionar información en estudios estructurales (Martínez, 2009).

CAPITULO 3

METODOLOGÍA

3.1 NIVEL DE INVESTIGACIÓN

Esta investigación comprende un diseño de nivel exploratorio debido a que es un tema poco estudiado o desconocido como lo es en este caso los microplásticos, por lo cual los resultados constituyen un nivel superficial del conocimiento sobre la presencia de estos. Además, esta investigación permitirá obtener datos o elementos que pueden formular o concluir con mayor precisión nuestra pregunta de investigación ¿Existe la presencia de microplásticos en las diferentes marcas de agua embotellada en la Regional 6?

3.2 DISEÑO DE LA INVESTIGACIÓN

La investigación realizada se basa en un diseño documental ya que se determinará la técnica a utilizar para la investigación. Adicionalmente se realizó un diseño de campo a través de la cual se procedió a levantar la información que está presente en las muestras tomadas.

3.3 POBLACIÓN Y MUESTRA

En este tema de investigación se trabajó con una población accesible, que se encuentra presente en todas las marcas de agua embotellada en la Regional 6 perteneciente a las provincias del Azuay, Cañar y Morona Santiago. Sin embargo, las marcas que se han determinado son aquellas que cumplen con todos los requisitos para su distribución en el mercado.

Se eligió las cuatro marcas de agua embotellada más consumidas por la población, mediante un muestreo aleatorio se procedió a tomar 18 muestras de cada marca dándonos un total de 72 muestras.

En la provincia del Azuay se recolectó 28 botellas de agua, en Cañar 28 y en la provincia de Morona Santiago 16.

3.4 VARIABLES

En el presente trabajo de investigación se ha podido determinar que la variable independiente es el agua embotellada a la misma que se les ha asignado un código marca A, B, C, D, por otra parte, la variable dependiente corresponde a la presencia, cantidad y tamaño de microplásticos.

3.5 TÉCNICAS E INSTRUMENTOS DE RECOLECCIÓN DE DATOS

De acuerdo con los diseños antes mencionados, las técnicas utilizadas en este tema de investigación son de tipo documental ya que se seleccionó documentos con ayuda de bases de datos como Scopus, Scielo, Springer, Repositorios Universitarios y Web of Science. También se llevó a cabo la técnica de observación puesto que se utilizaron instrumentos de forma estructurada como la lista de cotejo y como no estructurada el microscopio y la cámara fotográfica.

3.6. TÉCNICAS DE PROCESAMIENTO Y ANÁLISIS DE DATOS

Las técnicas de procesamiento de datos que se utilizaron en la investigación fueron tablas realizadas en Excel 2010 al igual que gráficas y estadística descriptiva

para comprender los valores obtenidos. Posteriormente se realizó un análisis de datos utilizando el Análisis de Varianza (ANOVA) a través del programa estadístico Minitab.

3.7 MATERIALES

Los materiales, reactivos y equipos a utilizar en esta investigación se presentan en la tabla1.

Tabla 1: Descripción de los materiales, equipos y reactivos utilizados.

Materiales	Equipos	Reactivos
Tamiz de Cobre 90 um	Bomba de vacío	Peróxido de Hidrógeno al 30%
Matraces Erlenmeyer de 500 ml y 1000 ml	Cámara de flujo laminar	Agua destilada
Embudo Buchner	Microscopio invertido de fluorescencia	Agua MilliQ
Matraz Kitasato 1000 ml	FTIR	
Probetas de 100ml		
Filtro de membrana de politetrafluoroetilo de 1 um		
Pinza metálica		
Cubre objetos		
Porta objetos		
Cajas Petri		
Papel aluminio		

Fuente: Elaboración propia.

3.8 PROCEDIMIENTO

3.8.1 Fase 1: preparación de la muestra

Una vez adquiridas las diferentes muestras en los lugares más comerciales del Azuay, Cañar y Morona Santiago, se tomó 500 mL de cada una de las muestras, sometiéndolas a calentamiento de 60°C en baño María con la finalidad de mejorar sus características de fluidez en el proceso.

3.8.2 Primera filtración

Luego de que las muestras han pasado por el proceso antes mencionado se procede a filtrar las mismas por un tamiz de acero de 90 µm.

3.8.3 Oxidación

Al residuo del tamiz de acero de 90 µm se enjuagó con 500 mL de agua de tipo I antes de colocarlo en un recipiente de vidrio y se trató con 50 mL de peróxido de hidrógeno al 30%. En el caso del filtrado, se colocó en un matraz Erlenmeyer de 1000 mL con 50 mL de peróxido de hidrógeno al 30%. Los dos recipientes se dejaron reposar a temperatura ambiente durante 72 horas.

3.8.4 Segunda microfiltración al vacío

El material oxidado después de haber transcurrido las 72 horas se filtró por una membrada de politetrafluoroetileno (PTFE) con un tamaño de poro de 1 µm y un diámetro de 47 mm. Dejando secar a temperatura ambiente durante 24 horas.

3.8.5 Fase 2: observación y medición en microscopio invertido

Se colocó el filtro de membrana de politetrafluoroetileno en medio de dos portaobjetos y se procedió a observar la presencia de microplásticos utilizando el lente de 10x. A través del programa de análisis de imagen NIS se procedió a tomar las longitudes de los fragmentos y fibras que se iban observando con ayuda del microscopio invertido.

3.8.6 Fase 3: caracterización

Una vez identificado los microplásticos en los filtros de membrana de politetrafluoroetileno a través del microscopio invertido se llevó a cabo el proceso de caracterización utilizando el quipo FTIR con el analizador de reflectancia total atenuada ATR, identificando el tipo de microplásticos mediante el programa OMNIC Specta.

CAPITULO 4

ANÁLISIS Y RESULTADOS

Al evaluar las muestras de agua embotellada de las diferentes marcas se pudo apreciar que existe la presencia de microplásticos en todas las muestras, caracterizadas con un número total de partículas encontradas en las mismas que se detallan en las tablas 6, 7, 8 y 9.

4.1 Determinación del tamaño de partículas observadas

A continuación, se procedió a determinar la dimensión de las partículas observadas. A través del microscopio invertido con un enfoque de 10x se observó la presencia de partículas plásticas, fragmentos y fibras, y, con ayuda del software análisis de imágenes NIS, se obtuvo las dimensiones.

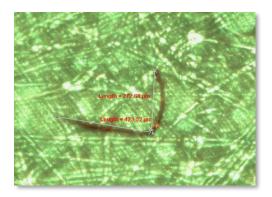


Figura 1: Dimensión de una fibra.

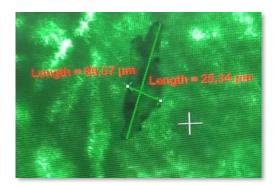


Figura 2: Dimensión de un fragmento.

Con la dimensión tomada de todas las muestras y por la dispersión que presentan las partículas en las muestras realizadas se procedió a calcular el rango, ya que esto indicará el intervalo entre el valor máximo y mínimo de las muestras. A continuación, se procedió a aplicar la siguiente ecuación:

Ecuación 1: Distribución de tamaño de fragmentos.

$$Distribución \ de \ tama\~no = \frac{(largo + ancho) \ um}{2}$$

Mediante la ecuación 1 se obtuvo el rango de las partículas observadas en cada muestra, encontrándose dentro de los parámetros establecidos. Estas deben estar en un rango de 1 μ m a 250 μ m.

Tabla 2: Rango de distribución de tamaño de micropartículas encontradas.

MARCAS DE		Rango de par	Rango de partículas (µm)					
AGUA CMBOTELLADA	N° de muestra	Fibras	Fragmentos					
	M-1	135.09 – 605.78	11.10 – 99.36					
	M-2	120.05 - 601.50	15.02 - 83.59					
	M-3	465.02 - 708.66	11.14 - 88.74					
	M-4	140.09	8.55 - 87.96					
	M-5	102.64 - 683.74	9.92 - 95.41					
	M-6	203.04 - 509.12	12.97 - 100.03					
	M-7	156.98 - 602.35	9.61 - 129.03					
	M-8	109.43 - 697.51	7.64 - 116.15					
A	M-9	••••	8.07 - 101.16					
A	M-10	270.66 - 743.96	6.34 - 99.17					
	M-11	135.72 - 364.91	9.02 - 131.60					
	M-12	276.54 - 668.34	4.50 - 126.77					
	M-13	324.06 - 599.16	9.75 - 98.76					
	M-14	••••	8.23 - 111.33					
	M-15	132.47 - 304.40	7.95 - 113.37					
	M-16	156.03 - 592.63	15.40 - 103.94					
	M-17	195.87 - 840.20	8.64 - 105.13					
	M-18	603.72	14.96 - 96.53					
	M-1	207.72	14.03 – 139.40					
	M-2		17.76 – 103.58					
	M-3		19.97 – 112.85					
	M-4		28.66 – 139.39					
	M-5	200.18 - 549.02	23.70 - 116.9					
	M-6		18.23 - 145.73					
	M-7	320.75	23.85 - 100					
В	M-8	••••	22.61 - 102.895					
	M-9	225.14 - 463.70	14.86 - 101.16					
	M-10	••••	27.245 – 103.095					
	M-11	••••	22.61 – 133.75					
	M-12	293.16 - 800.06	10.36 – 129.03					
	M-13	••••	13.32 – 96.84					
	M-14	••••	16.00 – 92.19					
	M-15		14.65 – 146.87					

	M-16	192.01 – 465.01	22.98 - 84.05		
	M-17	••••	17.02 – 98.62		
	M-18	270.07	20.65 – 107.46		
	M-1	140.36 - 587.28	8.86 – 150.76		
	M-2	207.39 – 674.41	8.27 – 135.42		
	M-3	••••	7.53 – 123.67		
	M-4	311.94	4.4 – 235.34		
	M-5	186.20- 643.84	8.86 – 150.57		
	M-6	416.62	12.55 – 215.65		
	M-7	••••	6.35 - 247.02		
	M-8	••••	5.4 – 215.00		
~	M-9	197.82 – 830.5	9.76 – 198.4		
C	M-10	••••	12.45 – 238.48		
	M-11	136.93	11.04 – 228.97		
	M-12	••••	9.5 – 235.85		
	M-13	••••	7.54 – 156.57		
	M-14	206.49 – 527.7	7.57 – 247.36		
	M-15	••••	8.95 – 170.25		
	M-16	136.47 – 431.62	9.72- 215.21		
	M-17	249.51 – 729.72	9.5 – 198.89		
	M-18	••••	11.24 – 248.29		
	M-1	407.85 - 605.96	7.52 – 96.85		
	M-2	274.53	8.68 – 101.02		
	M-3	••••	7.59 – 102.91		
	M-4	••••	6.41 – 103.94		
	M-5	369.06 – 542.10	8.49 – 98.82		
	M-6	••••	7.41 – 105.98		
	M-7	386.08	13.83 – 100.96		
	M-8	516.92	9.68 – 240.05		
D	M-9	••••	7.42 - 238.25		
	M-10	••••	11.93 - 148.50		
	M-11	485.98 – 760.30	12.85- 104.96		
	M-12	••••	7.81 – 97.35		
	M-13	582.93 - 829.06	6.03 - 99.59		
	M-14	349.81	7.72 – 120.64		
	M-15	498.02 – 759.04	8.06 – 110.79		
	M-16		6.92 – 217.98		
	M-17	460.80 - 638.08	7.06 – 99.10		
		100.00 020.00	7.00 77.10		

M-18	481.92	11.74 126.48
Rango Total	102.64 - 840.20	4.4 - 248.29

Fuente: Elaboración propia.

En la tabla dos se aprecian las diferentes muestras de las marcas de agua embotellada al igual que el rango de las fibras y fragmentos que va desde 4.4-248.29 μ m, ratificando que se encuentran dentro del parámetro indicado (1-250 μ m). Caso contrario en las fibras no se obtiene un rango especifico debido a que tiene una longitud variable y un grosor de pocas micras, pero según Ding et al., (2018) es considerado microplástico ya que se encuentra dentro del rango (< 5 mm).

En la investigación realizada por Wiesheu y colaboradores (2016), analizaron 3 litros de agua mineral embotellada en el cual encontraron fibras sintéticas con un rango de 1 μm y 5mm, mientras que en las muestras de las marcas estudiadas en la presente investigación se encontró fibras con un rango desde 102.64 μm hasta 840.20 μm concluyendo así que se encuentra dentro del rango establecido (< 5 mm) según Ding y colaboradores (2018).

Durante el proceso de investigación se procedió a realizar la técnica estadística Análisis de Varianza (ANOVA) para determinar qué marca de agua embotellada contiene la mayor cantidad de microplásticos, encontrándose los resultados que se aprecian en la tabla 3.

Las hipótesis para este tipo de diseño se dan de la siguiente manera:

 $H_0 = Todas$ las medias son iguales.

 H_1 = No todas las medias son iguales.

Nivel de significancia = 0.05

Tabla 3: Análisis de Varianza de las Marcas de agua embotellada.

Fuente	GL	SC Ajust.	MC Ajust.	Valor F	Valor p
Factor	3	390974	130325	72.86	0.000
Error	68	121636	1789		
Total	71	512611			

Fuente: Elaboración propia.

El valor p obtenido es menor a 0.05 por lo cual se rechaza la hipótesis nula y se acepta la hipótesis alternativa, por lo tanto, se realizó el método de Tukey para definir cuál de las cuatro marcas se comportan de forma similar o diferente (Tabla 4).

Tabla 4: Comparación de las muestras de cada marca por el método de Tukey.

Factor	N	Media	Agrupación				
Marca B	18	233.1	A				
Marca C	18	95.00		В			
Marca A	18	70.78		В	С		
Marca D	18	40.61			С		

Fuente: Elaboración propia.

Las medias que no comparten con una letra son significativamente diferentes como se puede observar en la tabla 4.

Al analizar las muestras de las cuatro marcas de agua embotellada de la Regional 6 se concluyó que el 100% de las muestras presentan partículas de microplástico en un promedio de 12.2 partículas por litro de agua, sin embargo, el estudio realizado por Mason y colaboradores en el 2018 analizaron once marcas de agua embotellada de origen mundial concluyendo que el 93% de las muestras presentaron microplásticos en un promedio de 10.4 partículas por litro de agua. Como se puede apreciar en esta investigación tiene un promedio mayor de partículas plásticas.

4.2 Caracterización del tipo de microplásticos a través de FTIR

Para la caracterización se procedió primero a la observación de las muestras de cada marca a través del microscopio invertido, identificando en qué cuadrante de la muestra se encontraban partículas mayores a 130 µm ya que menores a estas el FTIR estaría fuera de su rango de análisis. A continuación, se conoció la composición del filtro a través del espectro emitido para posteriormente realizar una resta espectral. A través del Software OMNIC las muestras de las marcas analizadas produjeron un espectro diferente a la del filtro, estos resultados fueron comparados con la biblioteca que se encuentra en el Software OMNIC Specta dando así la identificación de varios tipos de polímeros.

Se procedió analizar en cada una de las muestras alrededor de cuatro partículas en las cuales se determinaron los siguientes polímeros que se encuentran en la tabla 5.

Donde se puede observar que en todas las marcas existe una mayor probabilidad de polietileno.

Tabla 5: Porcentaje de los polímeros encontrados en las diferentes marcas de agua embotellada.

Marcas de	Tipos de Polímeros encontrados												
Agua													
embotellada	Polietileno	polietileno	polipropileno	poliamida	celofán	nylon							
		de alta											
		densidad											
A	69.4%				20.83%	9.77%							
В	89.6%		10.4%										
C	60%	30.3%		9.7%									
D	81.7%		18.3%										

Fuente: Elaboración propia.

Según Zhou y colaboradores (2021), al analizar las 23 marcas de agua embotellada encontraron polipropileno (0.93%), poliestireno (4.65%), polietileno (0.47%%), tereftalato de polietileno (6.98%), poliuretano (1.86%), policloruro de vinilo (1.4%), poliamida (4.19%), acetato de vinilo de polietileno (0.47%) y celulosa (63.6%). Concluyendo en su estudio que encontraron mayor parte de celulosa y poliamida. En cuanto a nuestra investigación como se pudo apreciar en la tabla 5 los resultados de los análisis determinaron que con mayor probabilidad se pudo encontrar polietileno en un rango de 60% - 89.6% en todas las muestras de agua embotellada,

suponiendo así que el porcentaje encontrado puede deberse al desprendimiento o descomposición de su envase.

De acuerdo con los resultados obtenidos se puede dar respuesta al objetivo general es decir que en las diferentes marcas determinadas con las letras A, B, C y D se puede afirmar que existe la presencia de microplástico, y a la vez se está dando respuesta a la hipótesis y a la pregunta de investigación.

CAPÍTULO 5

CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

5.1 Conclusiones

Existe la presencia de micropartículas en todas las marcas de agua embotellada, presentándose en forma de fragmentos y fibras.

El tamaño de partícula determinado con el microscopio invertido y con el programa análisis de imágenes NIS registró que los fragmentos encontrados se encuentran en un rango de 4.4 – 248.29 μm indicando que están dentro de lo establecido (1-250 μm). En cuanto a las fibras presentó un rango de 102.64 – 840.20 μm, considerándose así macropartículas debido a que tienen un valor menor a 5mm.

La marca B se obtuvo una mayor cantidad de partículas, fibras y fragmentos, con una media de 233.1 partículas por litro de agua, mientras que en la marca D se observó una menor cantidad de micropartículas con una media de 40.61 partículas por litro de agua.

El tipo de microplásticos con mayor probabilidad que se encontró en las cuatro marcas de agua embotellada con ayuda del FTIR fue el polietileno, concluyendo así que es un tipo de plástico secundario.

Se cumple la hipótesis de investigación ya que si existe la presencia de microplásticos en aguas embotelladas en la Regional 6.

5.2 Recomendaciones

Se recomienda realicen diversas investigaciones en matrices terrestres, ya que hoy en día se han enfocado en realizar más estudios en matrices acuáticas dejando de lado el análisis de productos de mayor consumo.

Analizar las posibles fuentes de contaminación del agua embotellada por microplásticos en las diferentes etapas del proceso ya que podría ser una fuente de contaminación.

Evaluar los posibles impactos en la salud al ser ingeridos estos microplásticos secundarios.

Para facilitar el estudio de la presencia de microplásticos se recomienda utilizar la técnica de microscopia de fluorescencia para reconocer fácilmente su presencia.

REFERENCIAS

- Arraiza, N., Viguria, P. M., Navarro, J., & Ainciburu, A. (2001). *Manual de Microscopia*. https://bit.ly/3CTPBNZ
- Avio, C. G., Gorbi, S., & Regoli, F. (2015). Experimental development of a new protocol for extraction and characterization of microplastics in fish tissues: First observations in commercial species from Adriatic Sea. *Marine Environmental Research*, 111, 18-26. https://doi.org/10.1016/j.marenvres.2015.06.014
- Beltrán, M., & Marcilla, A. (2012). *Tecnología de polímeros. Procesado y propiedades*. Universidad de Alicante. https://bit.ly/2W1zNHT
- Bumbrah, G. S., & Sharma, R. M. (2016). Raman spectroscopy Basic principle, instrumentation and selected applications for the characterization of drugs of abuse. *Egyptian Journal of Forensic Sciences*, 6(3), 209-215. https://doi.org/10.1016/j.ejfs.2015.06.001
- Chávez Carrillo, B. A. (2019). Presencia de Microplastico derivado de la degradación de tanques de reserva plasticos en el agua potable de Riobamba [Trabajo de Titulación, Universidad Nacional de Chimborazo]. http://dspace.unach.edu.ec/bitstream/51000/5608/1/UNACH-EC-ING-CIVIL-2019-0011.pdf
- Cox, K. D., Covernton, G. A., Davies, H. L., Dower, J. F., Juanes, F., & Dudas, S. E. (2019). Human Consumption of Microplastics. *Environmental Science* & *Technology*, *53*(12), 7068-7074. https://doi.org/10.1021/acs.est.9b01517

- Davis, R., & Mauer, L. (2010). Fourier tansform infrared (FT-IR) spectroscopy: A rapid tool for detection and analysis of foodborne pathogenic bacteria. technology and education topics in applied microbiology and microbial biotechnology, 2, 1582-1594.
- Deng, Y., Zhang, Y., Lemos, B., & Ren, H. (2017). Tissue accumulation of microplastics in mice and biomarker responses suggest widespread health risks of exposure. *Scientific Reports*, 7(1), 46687. https://doi.org/10.1038/srep46687
- Díaz, F. (2015). Tecnología de Materiales: Plásticos. Pdf. https://bit.ly/3g91LbX
- Ding, J.-F., Li, J.-X., Sun, C.-J., He, C.-F., Jiang, F.-H., Gao, F.-L., & Zheng, L. (2018).

 Separation and Identification of Microplastics in Digestive System of Bivalves.

 Chinese Journal of Analytical Chemistry, 46(5), 690-697.

 https://doi.org/10.1016/S1872-2040(18)61086-2
- Donoso, J. M. (2018). Cuantificación de la presencia de microplástico en la cuanca alta del Río Guayllabamba. *Universidad de las Américas*, 67.
- Ghosh, K. K., Burns, L. D., Cocker, E. D., Nimmerjahn, A., Ziv, Y., Gamal, A. E., & Schnitzer, M. J. (2011). Miniaturized integration of a fluorescence microscope.

 Nature Methods, 8(10), 871-878. https://doi.org/10.1038/nmeth.1694
- Hawach. (s. f.). *PTFE Membrane Filters*. Hawach. Recuperado 5 de agosto de 2021, de https://bit.ly/3CSSsql
- Ipohorski, M., & Bozzano, P. (2013). Microscopia electrónica de barrido en la caracterización de materiales. *Microscopia electrónica de barrido en la caracterización de materiales*, 3, 43-50.

- Koelmans, A. A., Mohamed Nor, N. H., Hermsen, E., Kooi, M., Mintenig, S. M., & De France, J. (2019). Microplastics in freshwaters and drinking water: Critical review and assessment of data quality. *Water Research*, *155*, 410-422. https://doi.org/10.1016/j.watres.2019.02.054
- Kosuth, M., Mason, S. A., & Wattenberg, E. V. (2018). Anthropogenic contamination of tap water, beer, and sea salt. *PLOS ONE*, *13*(4), e0194970. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0194970
- Kovacs, H., Moskau, D., & Spraul, M. (2005). Cryogenically cooled probes—A leap in NMR technology. *Progress in Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy*, 46(2), 131-155. https://doi.org/10.1016/j.pnmrs.2005.03.001
- Kulkarni, M., Warhade, K., & Bahekar, S. (2014). Primary Nutrients Determination in the Soil Using UV Spectroscopy. *International Journal of Emerging Engineering Research and Technology*, 2, 198-204.
- Lino, J. G. (2020). Microplástico en el tracto digestivo de Scomber japonicus,

 Opisthonema libertate y Auxis thazard, comercializados en el puerto pesquero

 de Santa Rosa, provincia de Santa Elena-Ecuador.

 https://repositorio.upse.edu.ec/handle/46000/5246
- Lusher, A. L., McHugh, M., & Thompson, R. C. (2013). Occurrence of microplastics in the gastrointestinal tract of pelagic and demersal fish from the English Channel. *Marine Pollution Bulletin*, 67(1-2), 94-99. https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2012.11.028
- Martínez, J. L. S. (2009). *Intrumentación y métodos de ánalisis químico*. 35.

- Mason, S. A., Welch, V. G., & Neratko, J. (2018). Synthetic Polymer Contamination in Bottled Water. *Frontiers in Chemistry*, 6, 407. https://doi.org/10.3389/fchem.2018.00407
- Miller, M. E., Kroon, F. J., & Motti, C. A. (2017). Recovering microplastics from marine samples: A review of current practices. *Marine Pollution Bulletin*, 123(1), 6-18. https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2017.08.058
- Mundo, B. C. (2017, agosto 6). ¿Cuánto microplástico contiene el agua que bebes? BBC News Mundo. https://www.bbc.com/mundo/noticias-41175253
- Oßmann, B. E., Sarau, G., Holtmannspötter, H., Pischetsrieder, M., Christiansen, S. H., & Dicke, W. (2018). Small-sized microplastics and pigmented particles in bottled mineral water. *Water Research*, *141*, 307-316. https://doi.org/10.1016/j.watres.2018.05.027
- O'Sullivan, C. (2014). Microplastics: An Issue of Scale [International Pollution Issues]. *Microplastics: An Issue of Scale*. https://bit.ly/3mekXsZ
- Padilha, A. F. (s. f.). Microscopia Eletrônica de Transmissão. *Microscopia Eletrônica de Transmissão*. Recuperado 9 de agosto de 2021, de https://bit.ly/3xRQBP3
- Pazos, R. S., Maiztegui, T., Colautti, D. C., Paracampo, A. H., & Gómez, N. (2017).
 Microplastics in gut contents of coastal freshwater fish from Río de la Plata estuary. *Marine Pollution Bulletin*, 122(1-2), 85-90.
 https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2017.06.007
- Pineda Santos, A. (2008). Estudio del tratamiento de un agua con alto contenido en silicatos de zirconio mediante Microfiltración y Ultrafiltración [Tesis doctoral,

- Universitat Politècnica de València]. En *Riunet*. https://doi.org/10.4995/Thesis/10251/2601
- Pucciarelli, M. (2009). *Microscopía Confocal*. https://bibliotecas.ups.edu.ec:3488/es/ereader/bibliotecaups/28240
- Recasens, F. (2015). *Procesos de separación de biotecnología Industrial*. Universitat Politècnica de Catalunya. https://bit.ly/2W9Nl4H
- Rivera, O., Álvarez, L., Rivas, M., Garelli, O., Pérez, E., & Estrada, N. (2020). *Impacto de la Contaminación por plástico:En áreas naturales protegidas mexicanas*.

 Pdf. https://bit.ly/3xRPIGi
- Rodríguez, W., García, P. A., & Fajardo, A. (2016). Aplicaciones de técnicas espectroscópicas para el análisis de suelos. *Revista Facultad de Ciencias Básicas*, 12(2), 228-251. https://doi.org/10.18359/rfcb.2030
- Sancho, J. C. (2012). Características generales de la Espectroscopía. https://bit.ly/3mhC7FZ
- SAPEA. (2019). A Scientific Perspective on Microplastics in Nature and Society.

 SAPEA. https://doi.org/10.26356/microplastics
- Sarria, R. A., & Gallo, J. A. (2016). La gran problemática ambiental de los residuos plásticos: Microplásticos. *Journal de Ciencia e Ingeniería*, 8(1), 21-27.
- Shruti, V. C., Pérez-Guevara, F., & Kutralam-Muniasamy, G. (2020). Metro station free drinking water fountain- A potential "microplastics hotspot" for human consumption. *Environmental Pollution*, 261, 114227. https://doi.org/10.1016/j.envpol.2020.114227

- Sierra, I., Chialanza, M. R., Faccio, R., Carrizo, D., Fornaro, L., & Pérez-Parada, A. (2020). Identification of microplastics in wastewater samples by means of polarized light optical microscopy. *Environmental Science and Pollution Research*, 27(7), 7409-7419. https://doi.org/10.1007/s11356-019-07011-y
- Wiesheu, A., Anger, P., Baumann, T., Niessner, R., & Ivleva, N. (2016). Raman microspectroscopic analysis of fibers in beverages. *Analytical Methods*, 8(28), 5722-5725. https://doi.org/10.1039/C6AY01184E
- Zhou, X., Wang, J., Li, H., Zhang, H., Hua-Jiang, & Zhang, D. L. (2021). Microplastic pollution of bottled water in China. *Journal of Water Process Engineering*, 40, 101884. https://doi.org/10.1016/j.jwpe.2020.101884

ANEXOS

Anexo A: Procesamiento de la muestra







Recolección de las muestras







Microfiltración en filtros PTFE de : μm

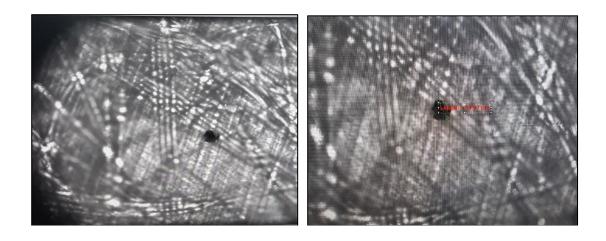


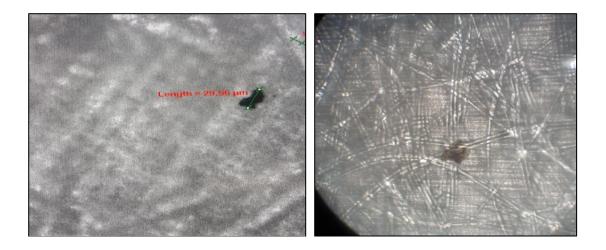
Secado de filtros a temperatura ambiente



Observación en el microscopio invertido con el Lente 10 x

Anexo B: Observación de las muestras con el microscopio invertido con el lente 10x.





Anexo C: Partículas encontradas en las muestras de agua embotellada.

Tabla 6: Total de partículas encontradas en la marca A.

		Fragmentos									
MUESTRAS		Cuadrantes			Total	(Cuad	rante	s	Total Fibras	Cantidad total do partículas
	1	2	3	4	Fragmentos	1	2	3	4	Total Fibras	1
A-M1	24	22	27	20	93	2	0	1	3	6	99
A-M2	18	24	10	14	66	1	1	1	2	5	71
A-M3	9	21	18	16	64	0	0	1	1	2	66
A-M4	25	14	19	17	75	0	0	1	0	1	76
A-M5	10	17	15	12	54	2	1	1	1	5	59
A-M6	12	15	20	21	68	1	0	0	1	2	70
A-M7	7	11	9	15	42	2	0	0	1	3	45
A-M8	22	25	23	21	91	1	1	1	0	3	94
A-M9	13	12	12	17	54	0	0	0	0	0	54
A-M10	15	18	16	8	57	1	1	1	1	4	61
A-M11	23	26	19	25	93	1	1	0	0	2	95
A-M12	17	21	14	10	62	2	2	1	1	6	68
A-M13	18	13	15	6	52	0	0	2	0	2	54
A-M14	21	12	13	18	64	0	0	0	0	0	64
A-M15	28	21	14	16	79	1	1	2	0	4	83
A-M16	25	23	20	22	90	0	1	0	2	3	93
A-M17	16	15	37	7	75	0	0	1	1	2	77
A-M18	10	7	16	11	44	0	0	1	0	1	45

Fuente: Elaboración propia.

Tabla 7: Total de partículas encontradas en la marca B.

B-M10

B-M11

B-M12

B-M13

B-M14

B-M15

B-M16

B-M17

B-M18

Fragmentos Fibras Cantidad total de **MUESTRAS Cuadrantes Total Cuadrantes** partículas **Total Fibras Fragmentos B-M1 B-M2 B-M3 B-M4 B-M5 B-M6 B-M7 B-M8 B-M9**

MUESTRAS DE LA MARCA "B"

Fuente: Elaboración propia.

Tabla 8: Total de partículas encontradas en la marca C.

					MUESTRAS DE	LAN	IARC	A "C	"		
			Fr	agmer	ntos				C 41.14.4.1.1.		
MUESTRAS		Cuadı	antes		Total		Cuad	rantes	S	Total Fibras	Cantidad total de partículas
	1	2	3	4	Fragmentos	1	2	3	4	Total Fibras	particulas
C-M1	33	24	34	25	116	1	2	1	0	4	120
C-M2	30	21	28	18	97	0	1	1	0	2	99
C-M3	28	33	27	34	122	0	0	0	0	0	122
C-M4	10	20	22	21	73	0	1	0	0	1	74
C-M5	17	24	25	19	85	1	1	0	2	4	89
C-M6	22	14	16	29	81	0	1	0	0	1	82
C-M7	19	12	14	20	65	0	0	0	0	0	65
C-M8	15	23	18	22	78	0	0	0	0	0	78
C-M9	27	24	33	28	112	1	0	0	1	2	114
C-M10	29	13	12	24	78	0	0	0	0	0	78
C-M11	16	27	19	22	84	0	1	0	0	1	85
C-M12	23	26	24	27	100	0	0	0	0	0	100
C-M13	19	23	17	26	85	0	0	0	0	0	85
C-M14	31	25	28	18	102	1	2	0	1	4	106
C-M15	14	22	19	28	83	0	0	0	0	0	83
C-M16	33	24	36	23	116	1	0	1	0	2	118
C-M17	26	26	29	32	113	0	1	0	1	2	115
C-M18	28	22	27	20	97	0	0	0	0	0	97

Fuente: Elaboración propia.

Tabla 9: Total de partículas encontradas en la marca D.

					MUESTRAS DE I	A M	ARC	A "D	,,					
		Fragmentos							Fibras					
MUESTRAS		Cuadı	antes		Total Fragmentos		Cuad	lrante	S	Total Fibras	Cantidad total de partículas			
	1	2	3	4	Total Fragmentos	1	2	3	4	Total Fibras	particulas			
D-M1	8	10	12	6	36	1	1	0	2	4	40			
D-M2	5	11	8	7	31	0	0	1	0	1	32			
D-M3	9	8	13	11	41	0	0	0	0	0	41			
D-M4	12	7	11	9	39	0	0	0	0	0	39			
D-M5	7	8	7	10	32	1	2	0	1	4	36			
D-M6	2	9	15	9	35	0	0	0	0	0	35			
D-M7	5	6	8	12	31	0	1	0	0	1	32			
D-M8	4	7	11	13	35	1	0	0	0	1	36			
D-M9	15	16	10	10	51	0	0	0	0	0	51			
D-M10	5	12	13	11	41	0	0	0	0	0	41			
D-M11	11	13	9	5	38	0	1	0	1	2	40			
D-M12	8	10	13	15	46	0	0	0	0	0	46			
D-M13	9	4	10	16	39	1	0	0	1	2	41			
D-M14	20	3	4	10	37	0	0	1	0	1	38			
D-M15	16	18	7	9	50	0	1	0	2	3	53			
D-M16	13	7	10	2	32	0	0	0	0	0	32			
D-M17	13	14	11	15	53	0	1	0	1	2	55			
D-M18	12	15	7	8	42	0	1	0	0	1	43			

Fuente: Elaboración propia

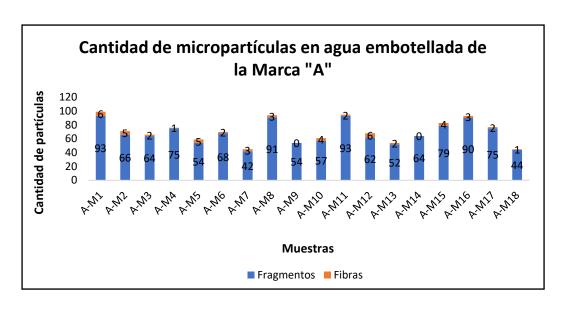


Figura 3: Cantidad de micropartículas en la marca "A".

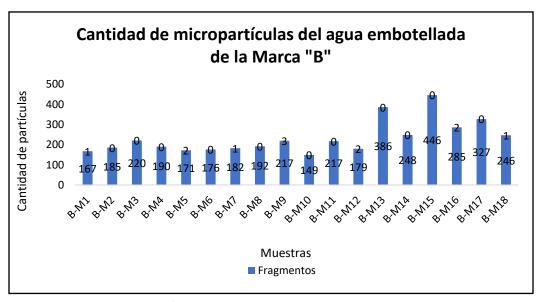


Figura 4: Cantidad de micropartículas en la marca "B".

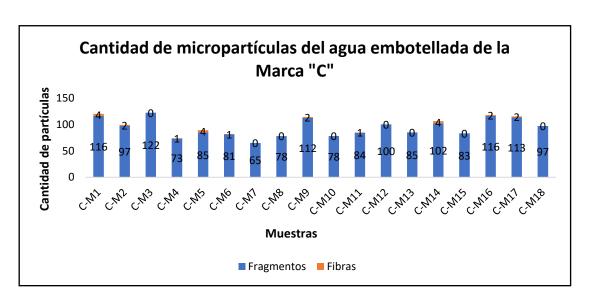


Figura 5: Cantidad de micropartículas en la marca "C".

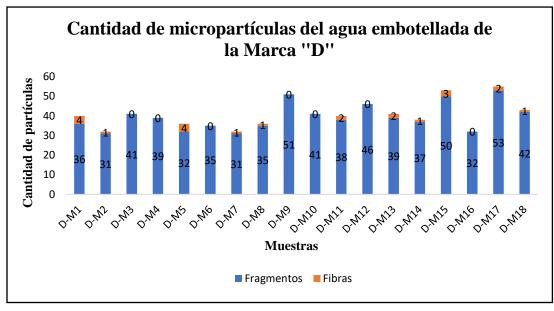
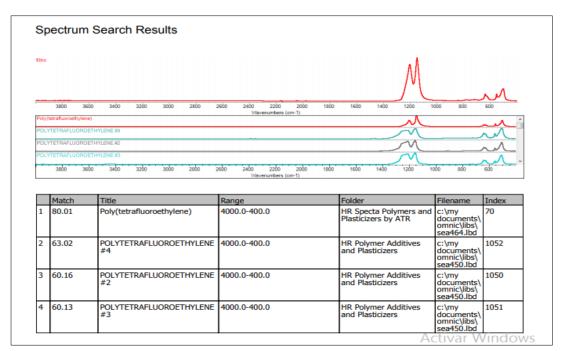


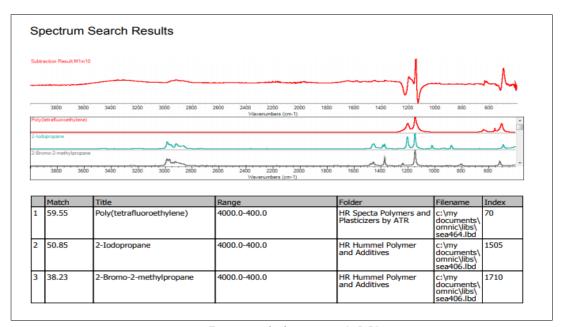
Figura 6: Cantidad de micropartículas en la marca "D".

Anexo D: Espectro infrarrojo del papel filtro

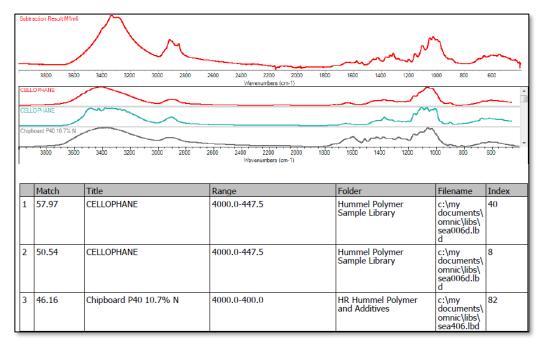


Reporte del Papel filtro

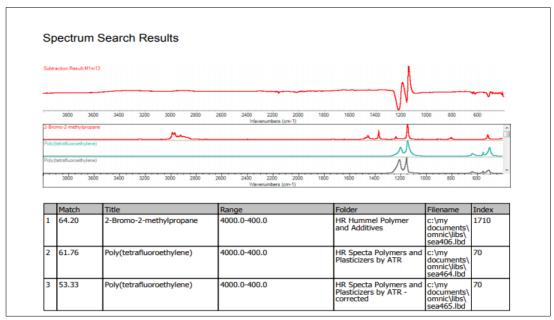
Anexo E: Espectros infrarrojos de estándares de microplásticos de la marca A.



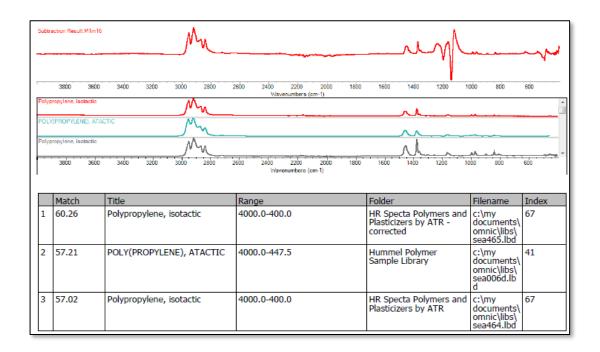
Reporte de la marca A-M1



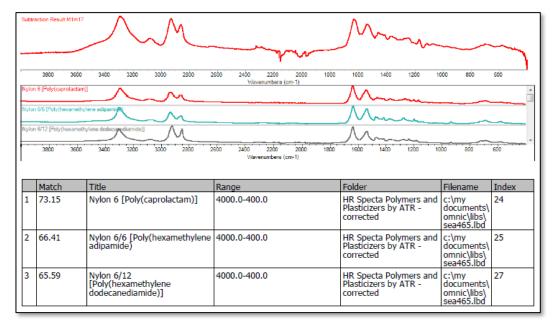
Reporte de la marca A-M6



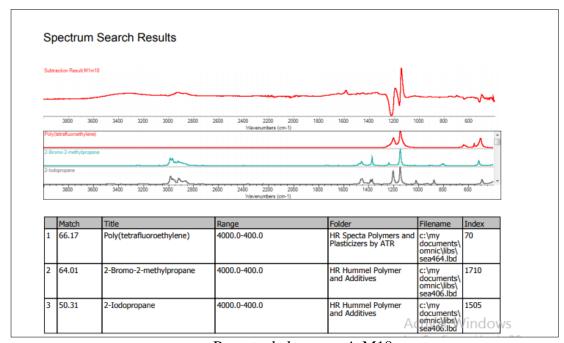
Reporte de la marca A-M13



Reporte de la marca A-M16

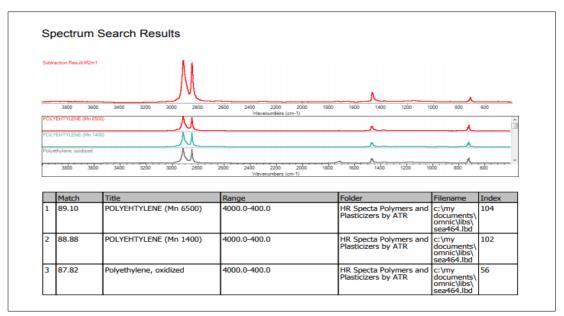


Reporte de la marca A-M17

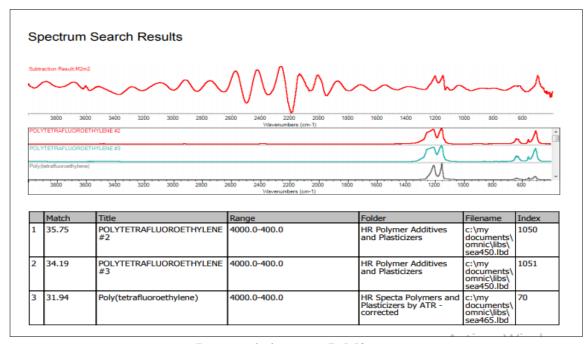


Reporte de la marca A-M18

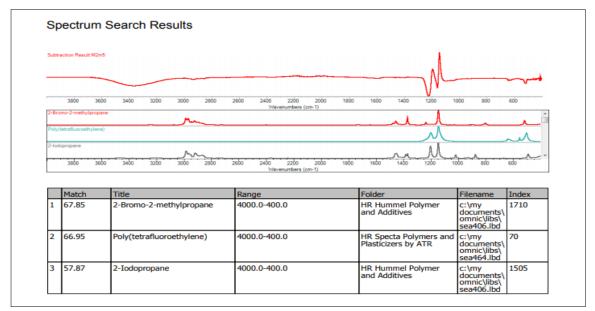
Anexo F: Espectros infrarrojos de estándares de microplásticos de la Marca B.



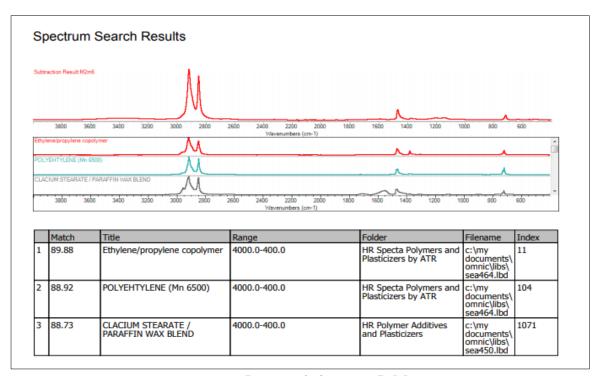
Reporte de la marca B-M1



Reporte de la marca B-M2

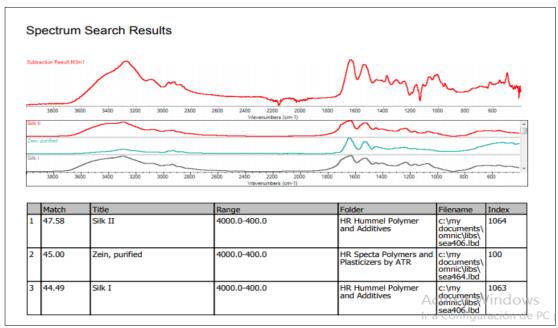


Reporte de la marca B-M5

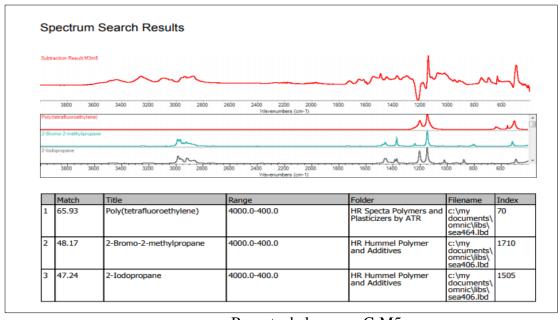


Reporte de la marca B-M6

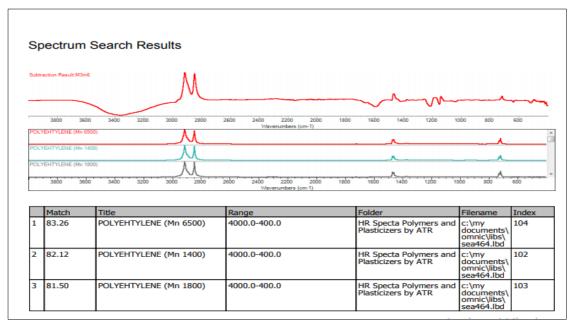
Anexo G: Espectros infrarrojos de estándares de microplásticos de la Marca C.



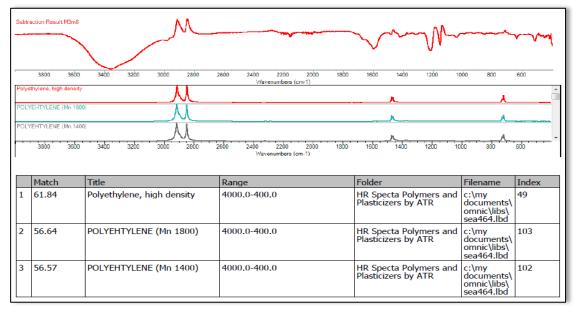
Reporte de la marca C-M1



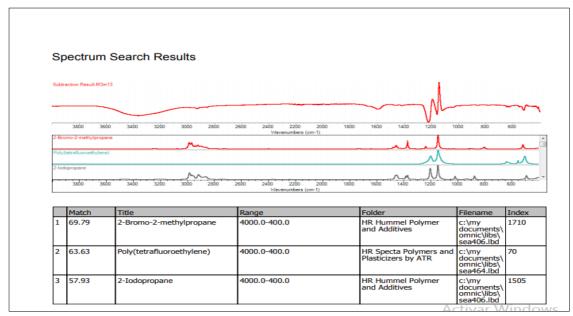
Reporte de la marca C-M5



Reporte de la marca C-M6

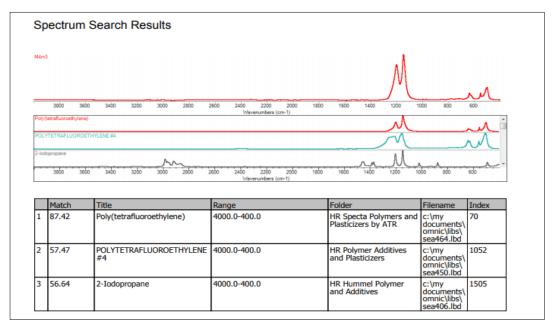


Reporte de la marca C-M8

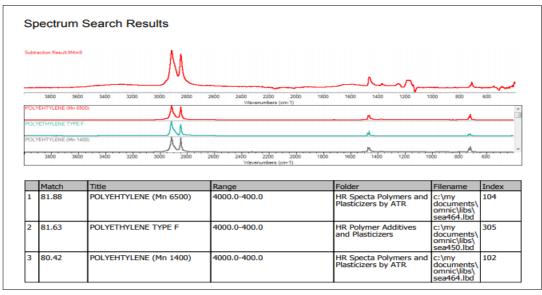


Reporte de la marca C-M13

Anexo H: Espectros infrarrojos de estándares de microplásticos de la marca D.



Reporte de la marca D-M3



Reporte de la marca D-M9.