



TRABAJO FIN DE GRADO

**GRADO EN
CIENCIAS DEL MAR**

Metodologías de extracción de microplásticos en tractos gastrointestinales de *Scylliorhinus canicula* (Linnaeus, 1758). Revisión bibliográfica.

Samuel Acevedo Quilis

Ana M^a Hernández Martínez

4º Ciencias del mar



AGRADECIMIENTOS

En primera instancia, quisiera agradecer a la Universidad Católica de Valencia por darme la oportunidad de presentar este Trabajo Fin de Grado.

Agradecer también al instituto IMEDMAR, su director, José Tena Medialdea, el coordinador de investigación, José Rafael García March, y a todo su personal por su apoyo.

Pero junto a ello, me gustaría dar gracias en especial a Ana M^a Hernández Martínez como tutora de este Trabajo Fin de Grado, no sólo por toda la ayuda y apoyo prestado durante el proceso de desarrollo del trabajo, sino también por darme la oportunidad de formar parte del "*Shark team*", realizar este proyecto de cara a futuro y permitirme conocer más de cerca el mundo de la investigación. También quisiera agradecer a Alejandro Jesús Molera por confiar en mí y crearme capaz de pertenecer a este equipo, realizar esta investigación y enseñarme acerca de todo este mundo.

Quisiera dar gracias a las técnicas de investigación, Beatriz y Samanta, de los laboratorios de "Santa Ursula" de la UCV por la compañía y la ayuda que nos han prestado en este corto período de tiempo. A mis compañeros de equipo de investigación Leire, Paula, Alejandro Suay, Enzo, Nicole y Jordana, gracias por formar parte de esta familia; y a mis compañeros de clase que han estado cerca de mí en el transcurso de estos meses, donde nos hemos apoyado codo con codo como el equipo y familia que hemos formado durante estos 4 años.

Y, por último, quiero agradecer a mis padres por apoyarme incondicionalmente durante estos 4 años de alti-bajos, por ayudarme cuando hacía falta incluso cuando creía que no, y por no dejar de creer en mí en todo momento.

ÍNDICE

1. INTRODUCCIÓN.....	3
1.1. Microplásticos.....	7
1.2. Efectos sobre organismos marinos.....	11
1.3. Metodologías de extracción de microplásticos.....	14
1.3.1. Digestiones ácidas.....	14
1.3.2. Digestiones oxidativas.....	15
1.3.3. Digestiones alcalinas.....	15
1.3.4. Digestiones enzimáticas.....	16
1.4. Grupos zoológicos en el estudio de microplásticos.....	16
1.4.1. <i>Scyliorhinus canicula</i>	17
2. OBJETIVOS.....	19
3. MATERIAL Y MÉTODOS.....	20
3.1. Bases de datos.....	20
3.2. Criterios de inclusión y exclusión.....	22
3.2.1. Criterios de inclusión.....	22
3.2.2. Criterios de exclusión.....	22
3.3. Ecuaciones de búsqueda.....	22
4. RESULTADOS.....	28
4.1. Resultados del análisis bibliométrico.....	28
4.1.1. Metodologías de digestión.....	35
4.1.1.1. Comunes.....	37
4.1.1.2. Ocasionales.....	40
4.1.1.3. Escasos.....	42
4.1.2. Grupos zoológicos empleados.....	44
4.1.2.1. Teleósteos.....	44
4.1.2.2. Moluscos.....	46
4.1.2.3. Crustáceos.....	47
4.1.2.4. Elasmobranquios.....	49
4.1.2.1.1. <i>Scyliorhinus canicula</i>	50
4.1.2.5. Reptiles marinos.....	50
4.1.2.6. Mamíferos marinos.....	50
4.1.2.7. Anélidos.....	51
4.1.2.8. Cnidarios.....	51
4.1.2.9. Priapulidos.....	51
4.1.2.10. Poríferos.....	51

5. DISCUSIÓN	52
6. CONCLUSIONES	69
BIBLIOGRAFÍA.....	71

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Evolución de la producción anual de plásticos desde 1950 hasta 2015. Fuente: Ritchie H, & Roser M, 2020.....	4
Figura 2. Concentraciones de desechos plásticos en las aguas superficiales del océano global. El gris oscuro y el gris claro representan zonas de acumulación internas y externas respectivamente. Fuente: Cózar A, <i>et al.</i> , 2014.....	5
Figura 3. Microplásticos primarios encontrados en ambientes acuáticos. Fuente: Crawford CB, & Quinn B, 2016.	9
Figura 4. Microplásticos secundarios encontrados en ambientes acuáticos. Fuente: Crawford CB, & Quinn B, 2016.	10
Figura 5. Porcentaje de artículos utilizados de cada base de datos con la EBS_1.....	30
Figura 6. Porcentaje de artículos utilizados de cada base de datos con la EBS_2.....	31
Figura 7. Porcentaje de artículos utilizados de cada base de datos con la EBS_3.....	33
Figura 8. Porcentaje de artículos utilizados de cada base de datos con la EBS_3.....	34
Figura 9. Productividad científica anual.....	35
Figura 10. Resultados del uso de las distintas metodologías de digestión.	35
Figura 11. Compuestos clasificados como “comunes” en los artículos empleados.	37
Figura 12. Resultados de digestión con HNO ₃ . a,c : Fibras originales. b,d : Fibras post-digestión. Fuente: Dehaut <i>et al.</i> , 2016.	39
Figura 13. Compuestos clasificados como “ocasionales” en los artículos empleados.	40
Figura 14. Producción científica de cantidad de publicaciones respecto a grupos zoológicos.....	44
Figura 15. Número de publicaciones en las cuales aparece cada especie de teleósteos.	45
Figura 16. Metodologías de digestión empleadas en teleósteos.	45
Figura 17. Número de publicaciones en las cuales aparece cada especie de moluscos.	46
Figura 18. Metodologías de digestión empleadas en moluscos.	47
Figura 19. Número de publicaciones en las cuales aparece cada especie de crustáceos.	48
Figura 20. Metodologías de digestión empleadas en crustáceos.	48
Figura 21. Número de publicaciones en las cuales aparece cada especie de elasmobranquios.	49
Figura 22. Metodologías de digestión empleadas en elasmobranquios.	49
Figura 23. Metodologías de digestión empleadas en <i>S. canicula</i>	50

Figura 24. Número de partículas plásticas encontradas por organismo. GSA-17: Mar Adriático; GSA-19: Mar Jónico; GSA-9: Norte del mar del Tirreno. Fuente: Giani et al., 2019.	52
Figura 25. Polímeros identificados post-digestión. Fuente: Wieczorek <i>et al.</i> , 2018	53
Figura 26. Composición por tamaño de microplásticos en el tracto digestivo de peces.	54
Figura 27. Abundancia y tipo de microplásticos encontrados en peces clasificados por peces.....	55
Figura 28. Acumulación de tipos microplásticos encontrados en función del tamaño de los peces. Fuente: Azizah and Saragih, 2019.	55
Figura 29. Resultados del estudio. A: tipos de polímeros encontrados en las muestras. B: tipología de los microplásticos según su forma en las muestras. Fuente: Digka <i>et al.</i> , 2018.	56
Figura 30. La distribución de microplásticos ingeridos según la tipología del polímero. Fuente: Naidoo <i>et al.</i> , 2019.....	56
Figura 31. Eficiencias de digestión por KOH y HNO ₃ a distintas condiciones. Fuente: Phuong <i>et al.</i> , 2017.....	57
Figura 32. Recuperaciones (en %) de los microplásticos (PE, PP, PVC). Fuente: Phuong <i>et al.</i> , 2017.....	57
Figura 33. Distribución de tamaño (A) y forma (B) de microplásticos extraídas de ejemplares de <i>Mytilus ssp.</i> Fuente: Lusher <i>et al.</i> , 2017.....	58
Figura 34. Resultados del estudio realizado en especies comerciales. a: Abundancia de microplásticos por peso. b: Abundancia de microplásticos por peso. c: Presencia (en %) de los diferentes tipos de tamaño de microplásticos por especie. Fuente: Li <i>et al.</i> , (2015).	59
Figura 35. Eficacia digestiva de tripsina, colagenasa y papaína a una concentración del 0.3125% en muestras de mejillón. Fuente: Courtene-Jones <i>et al.</i> , 2017.....	59
Figura 36. Tamaño medio de los polímeros antes y después de la digestión con 0,3125% de tripsina. Fuente: Courtene-Jones <i>et al.</i> , 2017.....	60
Figura 37. Distribución del tamaño de los microplásticos en los tractos gastrointestinales. Fuente: Hossain <i>et al.</i> , 2019.	61
Figura 38. Composición de polímeros recuperados de los estómagos de <i>N. norvegicus</i> y <i>A. antennatus</i> . Fuente: Cau <i>et al.</i> , 2019.....	61
Figura 39. Partículas sintéticas extraídas de <i>C. aestuarii</i> con los métodos de digestión enzimática y alcalina (KOH). Fuente: Piarulli <i>et al.</i> , 2019.....	62
Figura 40. Resultados de la digestión de <i>Nephrops norvegicus</i> . a: Eficiencia digestiva. b: Tasa de recuperación de polímeros. Fuente: Hará <i>et al.</i> , 2020.....	63

Figura 41. Microplásticos clasificados por morfología encontrados en tractos gastrointestinales de *R. terraenovae*. Fuente: Pullen, 2019. 64

Figura 42. Abundancia de artículos de plástico ingeridos por tres especies de elasmobranquios en la costa de Anzio (Mar Tirreno, Mediterráneo occidental). **a:** Número de microplásticos ingeridas recogidas del estómago. **b:** Número de microplásticos ingeridas recogidas intestino. **c:** Número de microplásticos ingeridas recogidas GI (tracto gastrointestinal, estómago + intestino). Fuente: Valente *et al.*, 2019. 65

Figura 43. Tabla resumen de los resultados post-digestión de tractos gastrointestinales de *S. canicula*. Fuente: Mancía *et al.*, 2020. 66

Figura 44. Resultados del proceso digestivo con NaOH 1M. **a:** Resultados de estómagos con presencias de microplásticos. **b:** Resultados de promedio de partículas en los estómagos contaminados. Fuente: Bellas *et al.*, 2016. 66

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Clasificación de distintos tipos de plásticos según su tamaño. Fuente: Crawford CB, & Quinn B, 2016.....	8
Tabla 2. Descriptores utilizados, sinónimos y su traducción al inglés.....	24
Tabla 3. Ecuaciones de búsqueda generales y específicas utilizadas en las diferentes bases de datos.	25
Tabla 4. Resultados obtenidos con EBG_1.....	28
Tabla 5. Resultados obtenidos con la EBG_2.....	29
Tabla 6. Resultados obtenidos con la EBS_1.	30
Tabla 7. Resultados obtenidos con la EBS_2.	31
Tabla 8. Resultados obtenidos con la EBS_3.	32
Tabla 9. Resultados obtenidos con la EBS_4.	33
Tabla 10. Productos y disoluciones utilizados en las publicaciones seleccionadas.....	37
Tabla 11. Resultados de distintos polímeros testeados en disoluciones alcalinas. Fuente: Dehaut et al., 2016.....	38
Tabla 12. Valores que representan el porcentaje de tejido blando de mejillón restante la digestión. Fuente: Claessens et al., 2013.	39
Tabla 13. Tabla resumen de las disoluciones y compuestos "escasos".	43

ÍNDICE DE ABREVIATURAS

PE.....	Polietileno
HDPE.....	Polietileno de alta densidad
LDPE.....	Polietileno de baja densidad
PP.....	Polipropileno
PET.....	Polietileno tereftalato
PVC.....	Policloruro de vinilo
PS.....	Poliestireno
PES.....	Poliéster
PA.....	Poliamida
PC.....	Policarbonato
ABS.....	Acrilonitrilo butadieno estireno
PMMA.....	Polimetilmetacrilato
PTFE.....	Politetrafluoroetileno
EPR.....	Caucho etil-propileno
EPDM.....	Caucho etileno-propileno-dieno
ePS.....	Polietileno expandido
NBR.....	Caucho nitrilo
CA.....	Acetato de celulosa
COPs.....	Compuestos orgánicos persistentes
PBTs.....	Toxinas bio-acumulativas persistentes
DDT.....	Dicloro difenil tricloroetano
PCB.....	Bifenil policlorado
EVA.....	Etilvinilo acetato
HNO ₃	Ácido nítrico
HCl.....	Ácido clorídrico
H ₂ SO ₄	Ácido sulfúrico
HClO ₄	Ácido perclórico
H ₂ O ₂	Peróxido de hidrógeno
NaOH.....	Hidróxido de sodio
NaClO.....	Hipoclorito de sodio
KOH.....	Hidróxido de potasio

$K_2S_2O_8$Persulfato de potasio
NaI.....Yoduro de sodio
EBG_1..... Ecuación de búsqueda general 1
EBG_2..... Ecuación de búsqueda general 2
EBS_1..... Ecuación de búsqueda específica 1
EBS_2..... Ecuación de búsqueda específica 2
EBS_3.....Ecuación de búsqueda específica 3
EBS_4.....Ecuación de búsqueda específica 4

RESUMEN

Actualmente, la contaminación del medio marino por desechos plásticos representa uno de los principales problemas ambientales, que afecta gravemente a la calidad de un número importante de hábitats y especies. Debido a ello, surge la necesidad de monitorizar los contaminantes plásticos presentes en el medio y sus efectos en la biota marina. Siguiendo esta línea, el análisis de los tractos digestivos en diferentes especies permite conocer la presencia de estos contaminantes y relacionarla con su efecto sobre el ecosistema.

En el presente trabajo se ha realizado una revisión bibliográfica de las diferentes metodologías de digestión utilizadas actualmente en los tractos digestivos de diversas especies marina y, concretamente en *Scyliorhinus canicula*. Para ello se consultaron diferentes buscadores y bases de datos entre marzo y mayo de 2020.

Las principales metodologías empleadas se clasifican en: metodologías de digestión ácidas (HNO_3 , HCl o $\text{HNO}_3:\text{HClO}_4$), oxidativas (H_2O_2 o $\text{K}_2\text{S}_2\text{O}_8$), alcalinas (KOH o NaOH) y enzimáticas (proteínasa-K o tripsina). Éstas se han aplicado en especies de varios grupos zoológicos, en los que se incluyen teleósteos, moluscos, elasmobranquios, crustáceos, reptiles y mamíferos marinos, anélidos y cnidarios. Las más utilizadas en *S. canicula* han sido metodologías alcalinas que emplean KOH y NaOH .

La producción científica en este campo ha sido muy abundante durante los últimos 5 años, con auge de publicaciones en 2019. Esto, junto a los pocos estudios encontrados en *S. canicula*, otorga una oportunidad para el estudio de microplásticos en los tractos digestivos en esta especie.

Palabras clave: microplásticos, *Scyliorhinus canicula*, digestión alcalina, extracción de microplásticos.

ABSTRACT

Currently, the pollution of the marine environment by plastic waste represents one of the main environmental problems, which seriously affects the quality of a significant number of habitats and species. Due to this, the need arises to monitor the plastic contaminants present in the environment and their effects on marine biota. Following this line, the analysis of the digestive tracts in different species allows knowing the presence of these pollutants and relating it to their effect on the ecosystem.

At the present work, a bibliographic review of the different digestion methodologies currently used in the digestive tracts of various marine species and, specifically, *Scyliorhinus canicula* has been carried out. For this, different search engines and databases were consulted between March and May 2020.

The main methodologies used are classified as: acid digestion methodologies (HNO_3 , HCl or $\text{HNO}_3:\text{HClO}_4$), oxidative (H_2O_2 or $\text{K}_2\text{S}_2\text{O}_8$), alkaline (KOH or NaOH) and enzymatic (proteinase-K or trypsin). These have been applied to species in various zoological groups, including teleosts, mollusks, elasmobranchs, crustaceans, reptiles and marine mammals, annelids and cnidarians. The most used in *S. canicula* have been alkaline methodologies that use KOH and NaOH .

Scientific production in this field has been very present in last 5 years, with a significant increase in publications in 2019. This, together with the few studies found in *S. canicula*, provides an opportunity for the study of microplastics in the digestive tracts in this species.

Key words: microplastics, *Scyliorhinus canicula*, alkaline digestion, microplastic extraction.

1. INTRODUCCIÓN

El término "plástico", proviene del griego "*plastikos*", referido a "algo adecuado para moldear", surgió en la década de 1630, y fue acuñado por primera vez por Leo Hendrick Baekeland en 1909, el cual se utilizó para describir una "sustancia que podía moldearse o darle una forma específica a voluntad" (Crawford and Quinn, 2019). Éstos son típicamente polímeros orgánicos que forman largas cadenas, que pueden estar ramificadas o reticuladas entre sí, formando una red de alta masa molecular, que a menudo contienen otras sustancias (Andrady, 2003a; Van der Vegt, 2006; Crawford and Quinn, 2019). Presentan propiedades excepcionales, como son: impermeabilidad, baja densidad, baja conductividad eléctrica, resistencia a la corrosión y otros factores químicos y biológicos; asociadas a su arquitectura molecular (Andrady, 2003a; Van der Vegt, 2006; Segura *et al.*, 2007; Crawford and Quinn, 2019). Los polímeros son abundantes en la naturaleza (celulosa esencialmente), los cuales se utilizan como materiales técnicos. Éstos son los "polímeros naturales" (Van der Vegt, 2006; Segura *et al.*, 2007). Otros, sin embargo, son modificados químicamente en su producción; es el caso de los denominados "polímeros sintéticos" (Van der Vegt, 2006; Segura *et al.*, 2007).

Estos polímeros son actualmente uno de los materiales predominantes a nivel mundial; ampliamente integrados en el estilo de vida actual, haciendo una contribución importante, al considerarse esenciales en casi todos los productos donde están presentes (Hammer, 2012; Williams, 2019). Por esta razón, los plásticos representan un punto de inflexión sin precedentes en la historia evolutiva de la Tierra, pues han permitido grandes avances tecnológicos (Crawford and Quinn, 2019).

Desde la década de 1940, tras la Segunda Guerra Mundial, la producción y consumo de plásticos a nivel mundial ha aumentado drásticamente, provocando el ingreso de desechos plásticos en el medio marino en cantidades similares a sus niveles de producción (Andrady, 2003b; Cole *et al.*, 2011).

Durante las dos últimas décadas del siglo XX, dicha tasa de ingreso y deposición se aceleró más allá de la tasa de producción, convirtiéndose en uno de los contaminantes más comunes y persistentes en las aguas oceánicas y playas de todo el mundo (Moore, 2008).

Además, especialmente en los últimos 60 años, se ha presenciado un incremento importante en la producción de plásticos. Desde 1950 hasta 2015, el crecimiento promedio fue de un 8,7% anual, pasando de 1,7 millones de toneladas a los casi 380 millones de toneladas actualmente (figura 1), resultando en un incremento del 200%, lo que equivale, aproximadamente, a la masa de dos tercios de la población mundial (Gourmelon, 2015; Lebreton and Andrady, 2019; Ritchie and Roser, 2020).

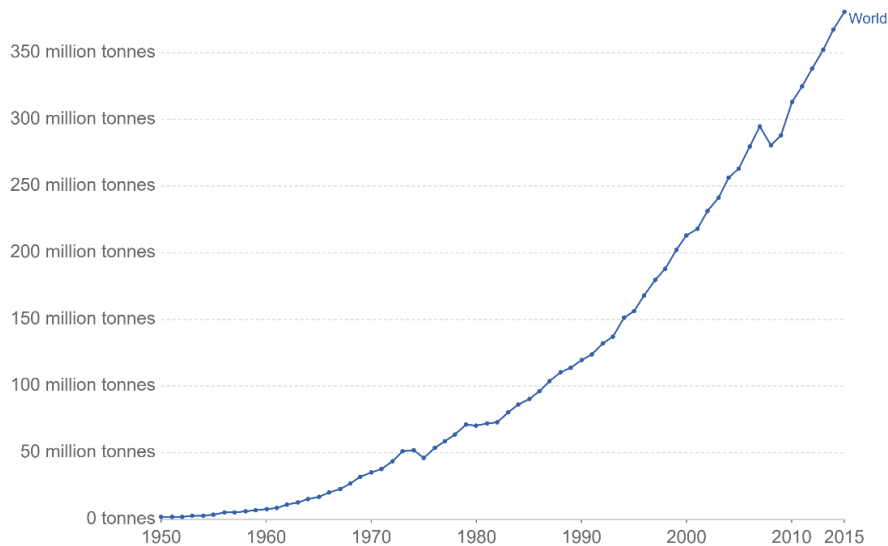


Figura 1: Evolución de la producción anual de plásticos desde 1950 hasta 2015. Fuente: Ritchie H, & Roser M, 2020.

Tal incremento ha provocado una acumulación de los desechos generados, que terminan en el medio marino por diversas vías de entrada, como pérdidas accidentales durante su producción, por un manejo inadecuado, residuos antrópicos en áreas densamente pobladas o industrializadas, o incluso vertidos directos (Derraik, 2002; Sheavly, 2007). De los desechos municipales a nivel mundial, el 16% está compuesto de plástico, y estimaciones actuales indican que entre el 15 y el 40% de estos desechos se liberan a los océanos (Derraik, 2002).

La basura plástica continental que acaba directamente en las aguas costeras, se estima que puede representar unas 4,8–12,7 millones de toneladas de desechos plásticos (Muenmee, 2015). Estas fuentes de entrada de desechos plásticos al medio marino influyen notablemente en su distribución en el medio. Las zonas costeras albergan diversas fuentes de entrada de desechos plásticos que desembocan en el ambiente marino, como vías fluviales, escorrentía o incluso vertidos directos al medio (Galgani, 2015; Chubarenko *et al.* 2018).

De estas cantidades de plásticos que llegan al océano, se estima que aproximadamente el 50% son desechos flotantes que se exportan desde aguas costeras hacia mar abierto, incrementando la frecuencia de desechos plásticos en aguas superficiales a nivel mundial gracias a zonas de convergencia y giros oceánicos que actúan como zonas de acumulación (figura 2) y que, junto a la acción del viento y los movimientos verticales de masas de agua, provocan la distribución masiva de estos desechos (Cózar *et al.*, 2014; Lusher, 2015).

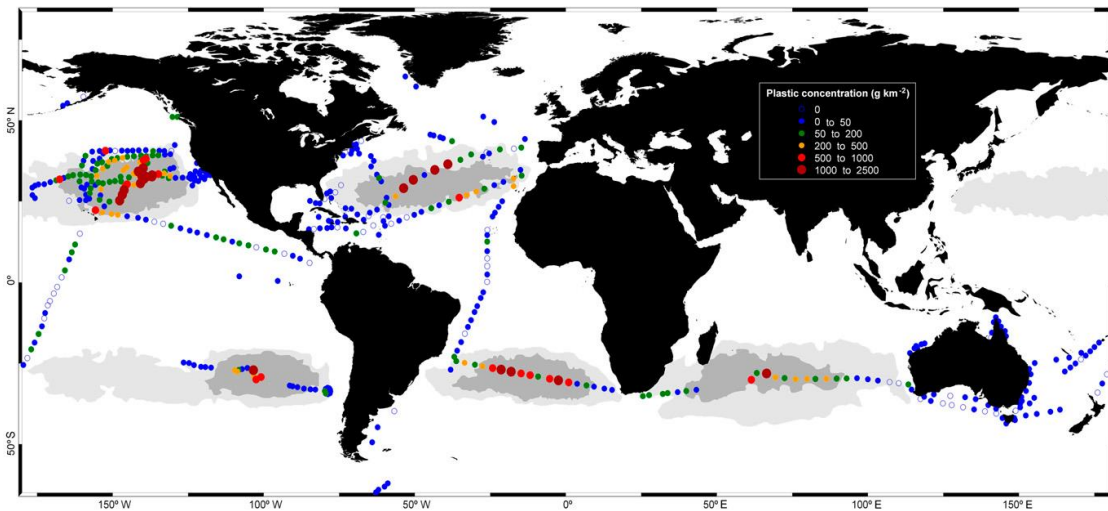


Figura 2: Concentraciones de desechos plásticos en las aguas superficiales del océano global. El gris oscuro y el gris claro representan zonas de acumulación internas y externas respectivamente. Fuente: Cózar A, *et al.*, 2014.

Esta acumulación de materiales plásticos, en muchas ocasiones, resulta ser nociva e incluso letal para los organismos marinos al introducirse en estos ecosistemas (Segura *et al.*, 2007). De hecho, la contaminación plástica y sus efectos sobre los organismos marinos se ha convertido en una preocupación mundial recientemente, pese a que los primeros informes de contaminación de los océanos por plásticos datan de la década de 1970 (Tigănuș *et al.*, 2019).

Los materiales plásticos más frecuentes son el polietileno (PE) (29,6% de la producción mundial), incluyendo al polietileno de alta densidad (HDPE) y el de baja densidad (LDPE), el polipropileno (PP) (18,9%), el polietileno tereftalato (PET) (6,9%), el policloruro de vinilo (PVC) (10,4%) y el poliestireno (PS) (7,1%) (Segura *et al.*, 2007; Leslie, 2014; Wu, 2016; Boucher, 2017; Helm, 2017; Ritchie and Roser, 2020).

El PE es químicamente más simple, y uno de los más abundantes en el medio marino (Maddah, 2016; Iñiguez-Cantos, 2019). Utilizado ampliamente en numerosas aplicaciones (envases comestibles, bolsas, etc...), se caracteriza por su densidad

inferior a la del agua y su carácter hidrofóbico, por ello se encuentra como plástico flotante (Andrady, 2003a; Crawford and Quinn, 2019; Iñiguez-Cantos, 2019). Presenta dos variantes muy presentes en el medio marino, el HDPE y el LDPE; caracterizados por unas densidades específicas de entre 0,94 a 0,97 g/cm³ y de 0,89 a 0,93 g/cm³ respectivamente y ambos son susceptibles a la foto-oxidación (Andrady, 2003a; Harris and Walker, 2010; Morét-Ferguson *et al.*, 2010; Maddah, 2016; Pešić *et al.*, 2016; Crawford and Quinn, 2019; Iñiguez-Cantos, 2019; American Chemistry Council, 2020).

El PP es uno de los polímeros de mayor importancia y más abundante en el medio marino (Van der Vegt, 2006; Iñiguez-Cantos, 2019). Es cristalino, ligero, versátil y resistente a solventes ácidos y alcalinos y posee una baja densidad (0,90 – 0,91 g/cm³) (Andrady, 2003a; Harris and Walker, 2010; Maddah, 2016; Crawford and Quinn, 2019; Iñiguez-Cantos, 2019; American Chemistry Council, 2020). Presenta cierta fragilidad cerca de los 0 °C y grietas ante la luz solar (Andrady, 2003a; Crawford and Quinn, 2019; Iñiguez-Cantos, 2019).

Otros de menor relevancia en cuanto a su representación en la producción mundial, como el PVC, se caracteriza por la presencia de cloro en su estructura (Crawford and Quinn, 2019); así como por tener una densidad de 1,16 a 1,41 g/cm³ y resistencia a la foto-degradación (Harris and Walker, 2010; Crawford and Quinn, 2019; Iñiguez-Cantos, 2019; American Chemistry Council, 2020). El PET es uno de los químicamente más estables, con una densidad de 1,38 – 1,41 g/cm³ pero propenso a hidrolizarse en agua o en condiciones húmedas y temperaturas de 73 a 78 °C (Andrady, 2003a; Harris and Walker, 2010; Morét-Ferguson *et al.*, 2010; Pešić *et al.*, 2016; Crawford and Quinn, 2019; Iñiguez-Cantos, 2019; American Chemistry Council, 2020; Morét-Ferguson, *et al.*, 2010). Y el PS es muy frágil y representa uno de los más peligrosos para la biota marina, al encontrarse comúnmente como plástico flotante (variante espumosa); ya que su densidad específica es de 1,04 – 1,08 g/cm³ (Andrady, 2003a; Morét-Ferguson, *et al.*, 2010; Crawford and Quinn, 2019; Iñiguez-Cantos, 2019; American Chemistry Council, 2020).

Junto a estos polímeros, cabe mencionar otros presentes en el medio marino como la PA o nylon, un polímero cristalino que exhiben elasticidad y una resistencia al desgaste excepcional (Andrady, 2003a; Harris and Walker, 2010; Crawford and Quinn, 2019; Iñiguez-Cantos, 2019). El PC, caracterizado por ser vidrioso con una gran resistencia al

impacto, es uno de los polímeros más densos (1,20 g/cm³). Debido a ello se utiliza como sustituto del vidrio e incluso de metales (Andrady, 2003a; Harris and Walker, 2010; Crawford and Quinn, 2019). Y el ABS, que pese a presentar una excelente resistencia al impacto, en el medio marino tiende a volverse más frágil a la exposición de la luz solar, apareciendo incluso en fondos oceánicos (Andrady, 2003a; Harris and Walker, 2010; Crawford and Quinn, 2019).

Ante el drástico incremento de la producción de plásticos, surge una problemática derivada de la aparición de los denominados microplásticos (Lee *et al.*, 2013). Éstos han surgido como una gran amenaza para el entorno marino, convirtiéndose en uno de los contaminantes emergentes más preocupantes debido a su permanencia en el medio. Esto se debe a que la mayoría de los plásticos actualmente en uso no son biodegradables y, de hecho, pueden permanecer en el medio hasta miles de años (Lee *et al.*, 2013; Crawford and Quinn, 2019).

1.1. Microplásticos

El término “microplástico” fue utilizado por primera vez por el Laboratorio de Materiales de la Fuerza Aérea de los Estados Unidos para describir “microdeformaciones que sufrían los materiales plásticos como respuesta a fuerzas externas”; pero no se definió como contaminante hasta 1972 tras observar su presencia en el mar de los Sargazos por parte de Carpenter y Smith (1972) en su publicación “*Plastics on the Sargasso Sea surface*” (Bayo *et al.*, 2020). En el 2004 el término “microplástico” fue aceptado y utilizado por la comunidad científica, junto al Comité de la Marina Nacional de la Administración Oceánica y Atmosférica (NOAA) para describir “aquellas piezas de plástico de tamaño de 5 mm hasta 1 mm” (tabla 1), generalmente como pequeños fragmentos, fibras y gránulos (Crawford and Quinn, 2019; Bayo *et al.*, 2020; Ritchie and Roser, 2020).

Tabla 1: Clasificación de distintos tipos de plásticos según su tamaño. Fuente: Crawford CB, & Quinn B, 2016.

Categoría	Abreviatura	Tamaño	Descripción
Macroplástico	MAP	≥ 25mm	Cualquier pieza de plástico igual o mayor de 25 mm de tamaño
Mesoplástico	MEP	< 25mm – 5mm	Cualquier pieza de plástico menor de 25mm hasta 5mm de tamaño
Plástico	PLT	< 5mm	Cualquier pieza de plástico menor de 5 mm de tamaño
Microplástico	MP	< 5mm – 1mm	Cualquier pieza de plástico menor de 5mm hasta 1 mm de tamaño
Mini-microplástico	MMP	< 1mm – 1µm	Cualquier pieza de plástico menor de 1mm hasta 1µm de tamaño
Nanoplástico	NP	< 1µm	Cualquier pieza de plástico menor de 1µm de tamaño

Con el auge de los estudios ecotoxicológicos relacionados con microplásticos en las últimas décadas, se ha comprendido el riesgo ecológico que representan en ambientes marinos debido principalmente a su pequeño tamaño, situándose dentro del rango óptimo de presas en organismos que desempeñan roles ecológicos de importancia (por ejemplo, depredadores) e incluso son destinadas al consumo humano (Galloway *et al.*, 2017; Everaert *et al.*, 2018).

Así pues, cabe destacar que los microplásticos pueden clasificarse en dos grandes grupos en función de su origen y morfología: los microplásticos primarios y los microplásticos secundarios (Lee *et al.*, 2013; Tigănuş *et al.*, 2019).

Los microplásticos primarios (figura 3) son aquellos liberados directamente al medio ambiente en forma de pequeñas partículas (Lee *et al.*, 2013). También denominados *pellets* (de 5 a 2 mm de diámetro), y "microperlas" (de 1 mm de diámetro), son la materia prima industrial en la producción de plásticos en transformadores para su fundición y

moldeo. Durante la fabricación, procesamiento, transporte y reciclaje de productos plásticos, se producen pérdidas provocando su arrastre y transporte hacia masas de agua, como lagos, ríos y estuarios, que acaban causando su acumulación en ambientes tanto de dulceacuícolas como marinos (Cole *et al.*, 2011; Lee *et al.*, 2013; Estahbanati and Fahrenfeld, 2016; Crawford and Quinn, 2019; Turner *et al.*, 2019).

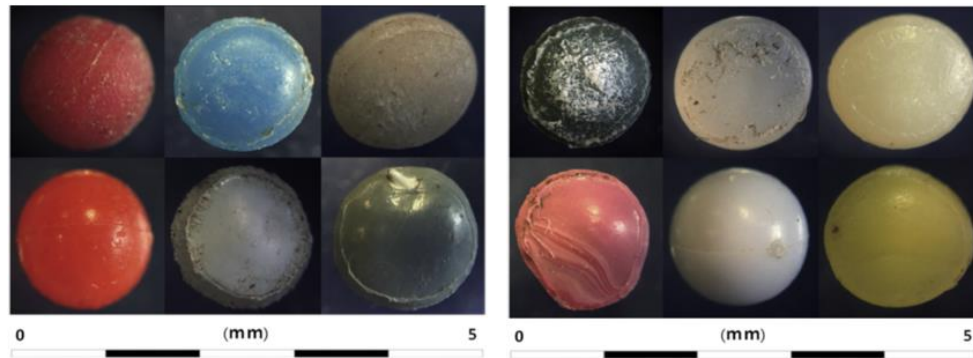


Figura 3: Microplásticos primarios encontrados en ambientes acuáticos. Fuente: Crawford CB, & Quinn B, 2016.

Actualmente, del total de vertidos de microplásticos primarios al medio marino, cerca de dos tercios (63.1%) se deben al lavado de textiles sintéticos (34.8%), a la erosión de los neumáticos durante la conducción (28.3%), y al polvo de las ciudades (24,2%) (Lee *et al.*, 2013; Everaert *et al.*, 2018). Al identificar sus características, puede establecerse su origen y uso, ya que los *pellets* y “microperlas” son utilizadas en productos de cuidado e higiene personal; por ende, su fuente procederá de efluentes urbanos o zonas industrializadas mayoritariamente (Jiang, 2018; Turner *et al.*, 2019), ya que éstos eluden los procesos de filtración de las plantas de tratamiento de aguas residuales, principal vía de entrada al medio marino de los microplásticos primarios (Tongesayi and Tongesayi, 2015; Helm, 2017; Jiang, 2018; Turner *et al.*, 2019).

Los microplásticos secundarios (figura 4) tienen su origen en la degradación de plásticos de mayor tamaño por procesos físicos, químicos y biológicos (como la foto-degradación, la degradación térmica o la degradación mecánica) una vez alcanzan el medio marino (Cole *et al.*, 2011; Lee *et al.*, 2013). Este grupo de microplásticos presentan una mayor dificultad en su monitoreo, ya que la fragmentación y degradación continua modifica ciertas propiedades presentes en la versión original del plástico (Blair *et al.*, 2018; Crawford and Quinn, 2019).

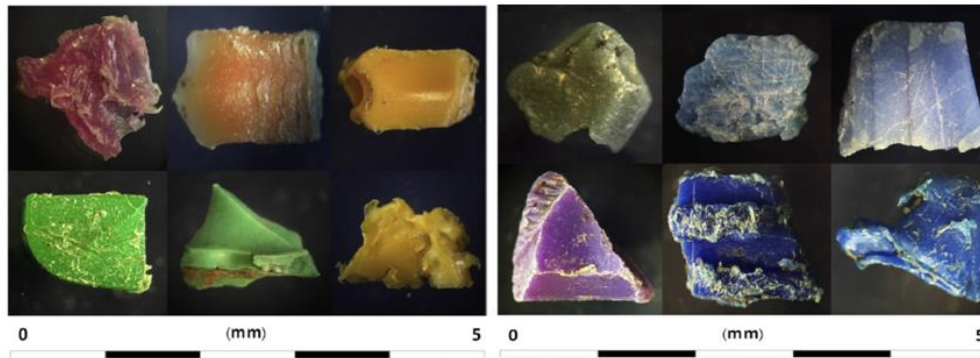


Figura 4: Microplásticos secundarios encontrados en ambientes acuáticos. Fuente: Crawford CB, & Quinn B, 2016.

La foto-degradación ocurre cuando materiales plásticos quedan expuestos, durante períodos prolongados, a la radiación ultravioleta (UV), provocando la oxidación de la matriz polimérica, especialmente en aquellas que contienen grupos fotoreactivos (cromóforos), los cuales sufren disociación por la colisión de un fotón cargado de energía con una molécula de polímero, resultando en la corrosión y lixiviación del plástico (White and Turnbull, 1994; Crawford and Quinn, 2019). Los signos más comunes son coloración amarillenta, grietas y fragilidad; aunque algunos polímeros (PVC, PMA o PTFE) son resistentes a la foto-degradación (White and Turnbull, 1994; Crawford and Quinn, 2019).

La degradación térmica es aquella provocada por cambios en la temperatura, al aportarse suficiente energía en forma de calor, para romper los enlaces de la matriz polimérica, provocando cambios como una disminución del peso molecular y un ablandamiento adicional (White and Turnbull, 1994; Crawford and Quinn, 2019). El impacto de degradación varía según el tipo de material y el ambiente en el que se encuentra, de forma que, en presencia de oxígeno, se produce una degradación termo-oxidativa; y a su vez, puede estar involucrado el estrés mecánico, conocido como degradación termo-mecánica (White and Turnbull, 1994; La Mantia *et al.*, 2017; Ray and Cooney, 2018). Junto a ello, la presencia de oxígeno puede catalizar la descomposición de ciertos materiales plásticos, a pesar de que esta degradación tiende a ocurrir a profundidades máximas de hasta 1 mm, ya que el oxígeno atmosférico no puede penetrar más allá de dicha profundidad (White and Turnbull, 1994; Crawford and Quinn, 2019). Sin embargo, el oxígeno no es el único gas capaz de degradar plásticos, el ozono y diversos óxidos tienen efectos degradantes sobre materiales plásticos (Crawford and Quinn, 2019).

Por último, la degradación mecánica es la responsable de la fragmentación de polímeros a causa de fuerzas externas (abrasión, acción del oleaje o turbulencia) que, con el

tiempo, convierte a las partículas de mesoplásticos y plásticos en microplásticos (Szyszkowska and Dagmara, 2017; Crawford and Quinn, 2019). Este proceso es la forma más eficiente de generación de microplásticos en el medio marino, el estrés continuo al que se someten da como resultado la ruptura del polímero, generando fragmentos que abarcan desde morfologías angulares bien definidas hasta fragmentos retorcidos y curvos (Derraik, 2002; Cole *et al.*, 2011; Helm, 2017; Szyszkowska and Dagmara, 2017; Crawford and Quinn, 2019; Chubarenko *et al.*, 2020).

Por tanto, su ubicuidad, persistencia y su pequeño tamaño, han convertido a los microplásticos en una de las mayores preocupaciones presentes en el medio marino, pues causan daños físicos a la vida marina, contamina las redes tróficas y actúan como vectores para multitud de contaminantes y elementos traza (Andrady, 2011; Germanov *et al.*, 2018).

1.2. Efectos sobre organismos marinos

La ingesta de microplásticos por parte de la biota marina, tanto por vertebrados como invertebrados, es una de las mayores afecciones al medio marino (Szyszkowska and Dagmara, 2017). Este fenómeno ha sido reportado en una gran variedad de invertebrados como anfípodos, copépodos, poliquetos, moluscos, etc... y en vertebrados marinos como peces, tortugas y mamíferos marinos (Cole *et al.*, 2013; Gutow, *et al.*, 2015; Ryan, 2016; Wang *et al.*, 2016; Galloway *et al.*, 2017).

Los organismos que presentan modos de alimentación específicos se consideran los más vulnerables a la ingesta directa de microplásticos, donde se incluyen organismos suspensívoros o filtradores, los cuales dependen de las partículas de alimento suspendidas en el agua circundante (Gutow, *et al.*, 2015; Connie Ka Yan *et al.*, 2016; Ryan, 2016; Wang *et al.*, 2016; Galloway *et al.*, 2017). La ingesta sucede debido a que la densidad de los microplásticos flotantes puede aumentar durante su residencia en el medio marino, a causa de sedimento en suspensión o fitoplancton que queda atascado en las grietas de la partícula, o por sobrecrecimiento microbiano en la superficie del microplástico (*biofilms*) (Lusher, *et al.*, 2013; Chubarenko *et al.*, 2016), provocando que alcancen una densidad similar a la del agua marina y pasarían a formar parte de la columna de agua, favoreciendo su ingesta (Cole *et al.*, 2013; Gutow, *et al.*, 2015). Independientemente del nivel trófico que ocupa un organismo o si es bentónico o pelágico, los efectos de la ingesta de microplásticos son comunes en aquellos organismos víctimas de este fenómeno. Esto se debe principalmente a la confusión y

sustitución de las presas habituales de los organismos por partículas de microplástico que pueden ser similares en cuanto a su color o morfología (Derraik, 2002; Connie Ka Yan *et al.*, 2016; Galloway *et al.*, 2017).

La capacidad de los microplásticos de bioacumularse y biomagnificarse causa el mismo impacto físico que su ingesta directa (Connie Ka Yan *et al.*, 2016). Diversos estudios han constatado que estadios larvarios y/o organismos plactónicos (copépodos especialmente) son los principales vectores de transmisión de microplásticos entre distintos niveles tróficos, encontrándose restos de microplásticos acumulados en los tractos intestinales de elasmobranquios, tortugas y mamíferos marinos, así como contaminantes asociados a éstos (Andrady, 2003b; Cole *et al.*, 2013; Lusher *et al.*, 2013; Wright *et al.*, 2013; Fossi *et al.*, 2014; Gutow *et al.*, 2015; Connie Ka Yan *et al.*, 2016; Chubarenko *et al.*, 2016; Ryan, 2016; Wang *et al.*, 2016). Estudios más actuales, realizados en el teleósteo *Myctophum aulolanternatum*, confirman la transferencia de piezas plásticas previamente suministradas a sus presas (Wright *et al.*, 2013; Fossi *et al.*, 2014). Esto también sucede en organismos de niveles tróficos superiores, por ejemplo, se han encontrado partículas de 1 mm de diámetro en leones marinos de Hooker (*Phocarctos hookeri*) del mismo material plástico que el presente en los otolitos del teleósteo *Electrona subaspera* (Fossi *et al.*, 2014).

Una vez los microplásticos se encuentran en el tracto gastrointestinal, causan graves efectos físicos, pudiéndose acumularse en los intestinos hasta alcanzar niveles letales (Wright *et al.*, 2013; Fossi *et al.*, 2014; Lei L, *et al.*, 2018). Son frecuentes los problemas fisiológicos asociados a la obstrucción del tracto intestinal, como el bloqueo de la absorción de los nutrientes, desembocando en la muerte del organismo por inanición (Germanov *et al.*, 2018) o por necrosis de las células de la mucosa y epiteliales presentes en los tractos intestinales (Qiao *et al.*, 2019). También puede provocar una reducción de la frecuencia de presas ingeridas, lo que conlleva una escasez de energía, reducción del crecimiento y una falsa sensación de saciedad (Galloway *et al.*, 2017); o incluso causar heridas internas que desembocan en la muerte del organismo (Lusher *et al.*, 2013; Wright *et al.*, 2013; Fossi *et al.*, 2014; Connie Ka Yan *et al.*, 2016; Chubarenko *et al.*, 2016; Ryan, 2016; Wang *et al.*, 2016; Lei *et al.*, 2018; Qiao *et al.*, 2019).

De la ingesta de microplásticos derivan otros problemas ambientales. Los microplásticos actúan como vectores de transmisión de otras sustancias contaminantes, tales como COPs, toxinas y metales pesados (Cole *et al.*, 2011; Iñiguez-Cantos, 2019). Estas sustancias pueden alterar determinados procesos fisiológicos e, incluso, el

comportamiento de organismos, resultando ser de gran preocupación para la salud humana y ambiental (Wright *et al.*, 2013; Gutow, *et al.*, 2015; Galloway *et al.*, 2017; Germanov *et al.*, 2018). Dado el carácter hidrofóbico de los microplásticos, numerosos compuestos tóxicos (COPs, PBT, DDT, PCB) y aditivos tóxicos de los procesos de manufacturación de los plásticos (compuestos antimicrobianos o nanopartículas de dióxido de titanio (TiO₂)) (Brander *et al.*, 2015; Wang *et al.*, 2016; Andrady, 2017; Guzzetti *et al.*, 2018; Lehtiniemi *et al.*, 2018; Rodrigues *et al.*, 2019) acaban adsorbidos a la estructura del polímero a causa de factores como la alta relación superficie-volumen o la difusividad y cristalinidad de los microplásticos (Wang *et al.*, 2016; Leed and Smithson, 2019).

Estos contaminantes terminan bioacumulándose en los eslabones superiores de las cadenas tróficas e, incluso, puede darse transferencia materno-filial (Germanov *et al.*, 2018; Baechler *et al.*, 2019) provocando un menor crecimiento, aumento del metabolismo, cambios en la tasa de alimentación (Connie Ka Yan *et al.*, 2016; Brander *et al.*, 2015), interrupción y mal funcionamiento de la fisiología del organismo, cambios en la expresión de genes que alteran el sistema inmune (Mancia *et al.*, 2020), daños en el ADN, daños oxidativos de enzimas disfuncionales, efectos neurotóxicos (Ribeiro *et al.*, 2017; Germanov *et al.*, 2018) y daños e inflamación en tejidos blandos como branquias, tejido intestinales y glándulas digestivas (Ika *et al.*, 2016). También alteran gravemente la aptitud reproductiva y disminuyen el crecimiento y supervivencia de la progenie (Germanov *et al.*, 2018; Jaikumar *et al.*, 2019), afectando al ciclo reproductivo, reduciendo cantidad de esperma y ovocitos (Crawford and Quinn, 2019), causando disrupciones endocrinas (Mancia *et al.*, 2020) y afecciones morfológicas severas a la descendencia (Jaikumar *et al.*, 2019). Junto a ello, se ha reportado recientemente la presencia de metales pesados como Cd, Co, Cu, Hg, Mn, Pb, Zn, entre otros (Wang *et al.*, 2016; Guzzetti *et al.*, 2018), presentes en partículas de microplásticos como residuos industriales o de pinturas (Brennecke *et al.*, 2016), y que quedan adsorbidos a su superficie por procesos de meteorización o presencia de biofilms (Wang *et al.*, 2016; Jaikumar *et al.*, 2019). Con esto, la movilidad y biodisponibilidad de los metales pesados se potencia al usar microplásticos como vectores de transporte, bioacumulándose más fácilmente y causando efectos tóxicos en los organismos, como la aparición de tumores (Cd) o efectos neurotóxicos (Hg) (Tchounwou *et al.*, 2012; Akhbarizadeh, *et al.*, 2017).

Desde el inicio del siglo XX se ha estudiado a fondo el efecto que tienen sobre los ecosistemas y la biota marinos, pero las medidas de prevención, análisis y alerta temprana no avanzan al unísono (Cole *et al.*, 2011; Wright *et al.*, 2013; Gutow, *et al.*,

2015; Syberg *et al.*, 2015; Galloway *et al.*, 2017). Actualmente, se realizan estudios para analizar la presencia de microplásticos tanto en la columna de agua (especialmente para microplásticos flotantes) como en el sedimento y la biota marina (Ika *et al.*, 2016; Jaikumar *et al.*, 2019). En este último caso, se plantea la opción más prometedora para la evaluación del grado de contaminación por microplásticos, pudiendo así evaluar la cantidad presente, su biodisponibilidad y su bioacumulación (Löder and Gunnar, 2015).

1.3. Metodologías de extracción de microplásticos

Existen diferentes metodologías para extracción de microplásticos de matrices orgánicas. En el caso de los organismos marinos, la extracción suele utilizar el organismo completo, en el caso de pequeños invertebrados (Lusher *et al.*, 2017); o usar una parte del organismo, concretamente el tracto gastrointestinal, en el caso de organismos de mayor tamaño (Lusher *et al.*, 2017; Wagner *et al.*, 2017; Lusher and Hernandez-Milian, 2018).

Estas metodologías se fundamentan en la digestión de las muestras y el posterior filtrado y / o la separación de los microplásticos. Para este tipo de digestiones, pueden ser disoluciones de diferente naturaleza, ya sean ácidos, alcalinos o enzimáticos (Dehaut *et al.*, 2016; Lusher *et al.*, 2017; Wagner *et al.*, 2017; Lusher and Hernandez-Milian, 2018; Munno *et al.*, 2018).

1.3.1. Digestiones ácidas

Diversos estudios emplean métodos de digestión ácida para aislar fibras, pellets y/o fragmentos de gran variedad de organismos, por su eficacia en destruir tejidos orgánicos al provocar escisión molecular y disolución rápida del material biogénico, dejando solo sílice y residuos microplásticos (Dehaut *et al.*, 2016; Lusher *et al.*, 2017). Su gran inconveniente es que es un proceso de digestión muy agresivo que daña a los polímeros en distintos grados en función de qué disolución sea empleada (Lusher *et al.*, 2017).

La extracción de microplásticos de tractos gastrointestinales (completo, no depurado) o tejidos blandos, se realiza mediante el uso de diferentes ácidos como HNO₃ al 5%, 35%, 65% o 69% (Claessens *et al.*, 2013; Cole *et al.*, 2014; ICES, 2015; Vandermeersch *et al.*, 2015; Dehaut *et al.*, 2016; Enders *et al.*, 2016; Catarino *et al.*, 2017; Lusher *et al.*, 2017; Miller *et al.*, 2017; Karami *et al.*, 2017; Syakti, 2017; Wagner *et al.*, 2017; Stock *et al.*, 2019; Liu, 2020), H₂SO₄ (Dehaut *et al.*, 2016), HCl al 5%, 37% (Cole *et al.*, 2014;

Dehaut *et al.*, 2016; Lusher *et al.*, 2017; Karami *et al.*, 2017; Stock *et al.*, 2019; Liu, 2020), HClO_4 (Lusher *et al.*, 2017; Wagner *et al.*, 2017), así como mezclas de distintos ácidos, por ejemplo, HNO_3 y HCl (Claessens *et al.*, 2013; Karami *et al.*, 2017; Syakti, 2017), $\text{HNO}_3:\text{HClO}_4$ (4:1 v:v) (ICES, 2015; Dehaut *et al.*, 2016), o incluso $\text{HNO}_3:\text{H}_2\text{O}_2$ (Vandermeersch *et al.*, 2015; Claessens *et al.*, 2013).

1.3.2. Digestiones oxidativas

Los agentes oxidantes son una buena opción en los procesos digestivos de material orgánico, los cuales pueden funcionar a diferentes concentraciones en la disolución que se esté implementando (al 30%, 15% o 10%) y según la matriz orgánica a digerir, ya sean organismos completos o tractos gastrointestinales de los mismos (Lusher *et al.*, 2016; Stock *et al.*, 2019). Avio *et al.* (2015) corroboró que es una metodología con una buena tasa de recuperación de microplásticos, no causando afecciones a la estructura de PE, PS o PP; y permitiendo el uso de espectrofotometría FTIR para la identificación de los mismos.

Los agentes oxidantes más habituales en los protocolos de digestión de muestras biológicas son el H_2O_2 (Claessens *et al.*, 2013; Vandermeersch *et al.*, 2015; Lusher *et al.*, 2016; Syakti, 2017; Wagner *et al.*, 2017; Munno *et al.*, 2018; Stock *et al.*, 2019; Liu, 2020); $\text{K}_2\text{S}_2\text{O}_8$ (Lusher *et al.*, 2016); $\text{H}_2\text{O}_2:\text{Fe(II)}$ (Liu, 2020) y disoluciones de $\text{H}_2\text{O}_2:\text{NaOH}$ o $\text{K}_2\text{S}_2\text{O}_8:\text{NaOH}$ (Miller *et al.*, 2017), así como las mencionadas anteriormente de $\text{HNO}_3:\text{H}_2\text{O}_2$ (Vandermeersch *et al.*, 2015; Claessens *et al.*, 2013).

1.3.3. Digestiones alcalinas

Las digestiones alcalinas actúan mediante la hidrólisis de enlaces químicos y desnaturalizando proteínas de la matriz orgánica (Lusher *et al.*, 2017). Si bien presentan menor capacidad de digestión en comparación con las digestiones ácidas y generan más residuos, resultan ser otra alternativa efectiva (Dehaut *et al.*, 2016; Lusher *et al.*, 2017). Son metodologías simples, con períodos cortos de digestión y con capacidad de usar FTIR / Raman para la identificación de los polímeros (Miller *et al.*, 2017). Junto a ello, presenta una tasa de recuperación muy elevada, pues Dehaut *et al.* (2016) demostró que mediante estas digestiones los polímeros sufren menos daños.

Existen muchos protocolos y adaptaciones, entre los cuales destaca el uso de disoluciones de NaOH al 1M, 10M (Cole *et al.*, 2014; Bellas *et al.*, 2016; Dehaut *et al.*,

2016; Karami *et al.*, 2017; Stock *et al.*, 2019; Liu, 2020), de NaClO (Miller *et al.*, 2017), de KOH al 10% (Dehaut *et al.*, 2016; Karami *et al.*, 2017; Miller *et al.*, 2017; Piarulli *et al.*, 2019; Reguera, *et al.*, 2019; Stock *et al.*, 2019; Mancía *et al.*, 2020; Liu, 2020; Xiaoyu *et al.*, 2020) y disoluciones mezcla como NaOH:K₂S₂O₈ y con H₂O₂ (Miller *et al.*, 2017). También se han realizado pruebas combinado disoluciones ácidas con alcalinas, como una disolución de NaOH (65%), HNO₃ y NaI (Miller *et al.*, 2017).

1.3.4. Digestiones enzimáticas

En algunos estudios, también se ha incorporado el uso de metodologías de digestión enzimática. Éstas resultan en una rápida y eficiente digestión muy específica al hidrolizar proteínas y descomponer tejidos blandos, sin causar daño en las estructuras óseas (Lusher *et al.*, 2017). Sus grandes desventajas radican en la necesidad de emplear soluciones homogeneizadoras (tampón Tris-HCl 400 mL, por ejemplo), y en los pocos estudios que avalen la tasa de recuperación de polímeros de las muestras a digerir (Lusher *et al.*, 2017; Miller *et al.*, 2017).

Las digestiones enzimáticas se basan en el uso de proteasas, como la proteinasa-K (Cole *et al.*, 2014; Miller *et al.*, 2017; Karlsson *et al.*, 2017; Liu, 2020), la tripsina (Catarino *et al.*, 2017; Miller *et al.*, 2017), la papaína (Courtene-Jones W, *et al.*, 2017; Miller *et al.*, 2017), la colagenasa (Miller *et al.*, 2017), la Corolase 7089 (Catarino *et al.*, 2017; Miller *et al.*, 2017), entre otras; y lipasas, principalmente Biozym F (Miller *et al.*, 2017; Piarulli *et al.*, 2019). Al igual que en los casos anteriores, también se han realizado pruebas al combinarse esta metodología con las anteriores, por ejemplo, con el empleo de disoluciones de KOH (10%), pepsinas, HCl, HNO₃ (65%), HClO₄ (65%), NaOH y K₂S₂O₈ (Miller *et al.*, 2017).

1.4. Grupos zoológicos en el estudio de microplásticos

Los grupos zoológicos utilizados para detectar la presencia de microplásticos en el medio marino son muy diversos y comprenden moluscos bivalvos (*Mytilus edulis*, *Mytilus galloprovincialis*) (Guzzetti *et al.*, 2018; Reguera *et al.*, 2019; Xiaoyu *et al.*, 2020), crustáceos (*Nephrops norvegicus*, *Carcinus aestuarii*) (Lusher *et al.*, 2013; Piarulli *et al.*, 2019; Hará *et al.*, 2020), teleósteos (*Mullus barbatus*, *Merluccius merluccius*, *Danio rerio*, *Salmo trutta*) (Bellas *et al.*, 2016; Karlsson *et al.*, 2017; Guzzetti *et al.*, 2018; Lei *et al.*, 2018), mamíferos marinos (*Balaenoptera physalus*) (Fossi *et al.*, 2014; Guzzetti *et al.*, 2018), tortugas marinas (*Caretta caretta*, *Chelonia mydas*) (Connie Ka Yan *et al.*, 2016)

y elasmobranquios (*Cetorhinus maximus*, *Scyliorhinus canicula*) (Fossi *et al.*, 2014; Bellas *et al.*, 2016; Mancía *et al.*, 2020).

En este sentido, biomonitorizar la contaminación plástica debe considerarse como una herramienta adicional para evaluar el estado del medio marino (Bonanno and Orlando-Bonaca, 2018) mediante el uso de organismos de los cuales se tenga suficiente información ecológica, biológica, de su importancia comercial, estado de conservación e ingesta de desechos plásticos documentada (Fossi *et al.*, 2018).

Uno de los grupos más prometedores para tal propósito son los elasmobranquios, especialmente los tiburones, que representan una pieza clave de los ecosistemas marinos, ya que son depredadores y se encuentran más expuestos a la biomagnificación al consumir presas contaminadas (Baum and Worm, 2009; Akhbarizadeh, 2019). De esta forma sufren los efectos nocivos de la ingesta de microplásticos y aquellos derivados de los contaminantes asociados, causando un declive de sus poblaciones ante la contaminación por microplásticos (Baum and Worm, 2009; Galloway, 2017; Akhbarizadeh, 2019).

1.4.1. *Scyliorhinus canicula*

Scyliorhinus canicula (Linnaeus, 1758, SC), comúnmente conocida como pintarroja, es una especie de la familia *Scyliorhinidae*, uno de los elasmobranquios más abundantes que habita en plataformas continentales del mar Mediterráneo central y occidental, y el Atlántico oriental (Valente *et al.*, 2019; Mancía *et al.*, 2020). Se trata es una especie demersal, caracterizada por ser depredadora oportunista que se alimenta de una amplia gama de fauna bentónica, como crustáceos, moluscos y pequeños teleósteos (Smith, 2018), muy frecuente en capturas by-catch por artes de pesca comerciales como redes de enmalle, pesca de anzuelo y de arrastre (Rodríguez-Cabello *et al.*, 2005; Kousteni, 2017).

Catalogada como mesodepredador (Smith, 2018), *S. canicula* representa una pieza clave en el esquema trófico de las comunidades de peces demersales, cuya ecología trófica es esencial para comprender la situación del ecosistema (Smith, 2018). Su adaptación trófica, según la disponibilidad de presas, es indicadora de cambios en las poblaciones de su hábitat (Olaso *et al.*, 2005; Rodríguez-Cabello *et al.*, 2005; Kousteni *et al.*, 2017; Barría *et al.*, 2018; Smith, 2018; Valente *et al.*, 2019). Estas características

facilitan la bioacumulación de microplásticos transferidos a lo largo de las redes tróficas del ecosistema (Ataño-Barboza, 2018).

Además, diversos estudios constatan que *S. canicula* presenta una fuerte filopatria sesgada por el sexo (Sims, 2003; Hueter *et al.*, 2005; Ruckstuhl and Neuhaus, 2006; Gubili *et al.*, 2014), donde las hembras tienden a permanecer en su hábitat por motivos reproductivos (Sims, 2003; Hueter *et al.*, 2005; Ruckstuhl and Neuhaus, 2006; Gubili *et al.*, 2014). Esta conducta convierte a *S. canicula* en una especie prometedora como biomonitor de microplásticos a pequeña escala, dada la limitación de su área de distribución (Fossi *et al.*, 2018), a partir de la digestión y análisis de los tractos gastrointestinales (Fossi *et al.*, 2018; Smith, 2018).

2. OBJETIVOS

Por todo lo anteriormente expuesto, el objetivo principal del presente Trabajo Fin de Grado es realizar una revisión bibliográfica sobre las distintas metodologías de extracción de microplásticos en tractos gastrointestinales de *Scyliorhinus canicula* y sobre cuáles podrían utilizarse con esta especie en un futuro. Para llevarlo a cabo se plantean los siguientes objetivos específicos:

- I. Analizar la producción científica sobre las distintas metodologías de extracción de microplásticos en organismos marinos.
- II. Clasificar las metodologías existentes en base a grupos zoológicos.
- III. Describir, tras realizar una extensa búsqueda bibliográfica, las distintas metodologías de extracción de microplásticos empleadas en tractos gastrointestinales de *Scyliorhinus canicula*.
- IV. Hacer una propuesta de metodología de extracción de microplásticos en tractos gastrointestinales de *Scyliorhinus canicula*.

3. MATERIAL Y MÉTODOS

La metodología empleada para llevar a cabo este Trabajo Fin de Grado fue el método de análisis documental, con el objetivo de obtener la información más actual sobre el tema principal de esta revisión, así como analizar las diferentes fuentes de información.

Se realizó una búsqueda bibliográfica sobre las diferentes metodologías de extracción de microplásticos que pueden utilizarse en la especie *Scyliorhinus canicula*, a fin de evaluar su eficiencia y la posibilidad de establecer una metodología estándar, adecuada a los tractos gastrointestinales de *S. canicula*.

3.1. Bases de datos

El período de tiempo acotado para la búsqueda bibliográfica comprende desde enero del 2000 hasta mayo del 2020. Las bases de datos consultados fueron: ScienceDirect, Scopus, Web of Science, Google Scholar, Dialnet y BioOne

ScienceDirect: plataforma digital y base de datos de consulta de publicaciones científicas, perteneciente a la editorial científico-académica Elsevier. Destaca por abarcar un amplio abanico de disciplinas, como física e ingeniería, ciencias de la vida y de la salud, y ciencias sociales y humanidades. Science Direct proporciona acceso a artículos de revistas, con un total de 15 millones de artículos, 4.000 títulos y más de 600.000 números; así como a monografías, con 37.000 libros. De estos, cerca de 200.000 son de acceso libre. En 2010 registró más 9,5 millones de documentos de alta calidad científica de 3.500 revistas académicas y 34.000 libros electrónicos. Aunque requiere de una suscripción o realizar un pago para obtener acceso al texto completo o un artículo; el motivo principal del uso de esta base de datos visión multidisciplinar y la accesibilidad de las publicaciones.

Scopus: base de datos bibliográfica de resúmenes y citas de artículos activa desde 2004, con aproximadamente 18.000 títulos de más de 5.000 editores, y 16.500 revistas científicas. Abarca temas de investigación en todas las disciplinas científicas y técnicas. Scopus está gestionada por la Fundación Española para la Ciencia y la Tecnología (FECYT), pero, forma parte de la empresa llamada Elsevier, como ScienceDirect. La utilización de esta base de datos se debe a razones similares a las de ScienceDirect, debido a que otorga una visión global multidisciplinar.

Web Of Science (WOS): principal base de datos de citas del mundo, con información

multidisciplinaria de cerca de 20.000 revistas científicas importantes. Gestionada por la Fundación Española para la Ciencia y la Tecnología (FECYT), y permitiendo acceso libre a instituciones como universidades y departamentos de. El uso de esta base de datos se debe a su amplia visión multidisciplinar, permitiendo acceder a una gran cantidad de publicaciones de diferentes áreas de conocimiento.

Google Scholar: o Google Académico, buscador que permite realizar de forma sencilla búsquedas amplias de literatura académica, pudiendo encontrar artículos, tesis, libros, resúmenes y otros sitios web. Este buscador contiene cerca de 389 millones de documentos. El uso de este buscador se debe a que es el que más documentos alberga y que actúa como motor de búsqueda, ya que puede dirigirte a distintas bases de datos cuando la publicación responde a la búsqueda.

ResearchGate: plataforma de acceso libre creada en 2008, que sirve como motor de búsqueda y base de datos de cualquier disciplina científica. Sus funciones de navegador permiten hallar resultados más precisos procesando resúmenes y artículos científicos mediante el análisis de la cantidad de términos utilizados en la búsqueda de palabras clave.

Dialnet: una de las mayores bases de datos de artículos científicos, junto a monografías y tesis, de habla hispana de acceso libre y sin ánimo de lucro. Inicialmente, en 2001, era una cooperación bibliotecaria en la Universidad de La Rioja. Recopila documentos publicados en España en cualquier lengua o que traten sobre temas hispánicos; sólo en 2018 albergaba cerca de 6 millones de documentos de 10.100 revistas. Su uso se debe principalmente a la multitud de documentos que hablan de estudios llevados a cabo o centrados en España.

BioOne: última base de datos utilizada en esta revisión. Creada sin ánimo de lucro, reúne a sociedades científicas, editores y bibliotecas con cerca de 200 publicaciones de acceso libre sobre ciencias biológicas, ecológicas y ambientales. Siendo un portal web confiable con artículos de investigación de alta; al realizar búsquedas no se obtuvieron grandes resultados en esta base de datos.

3.2. Criterios de inclusión y exclusión

Para la selección de los documentos que finalmente fueron empleados en el presente Trabajo Fin de Grado, se definieron los criterios de inclusión y de exclusión que se detallan a continuación.

3.2.1. Criterios de inclusión

- I. Artículos publicados en revistas científicas, en portales Web, intervenciones en conferencias y revisiones.
- II. Documentos publicados tanto en español como en inglés
- III. Trabajos cuyos títulos y temática guardan relación con el ámbito de estudio de este trabajo y cuyos objetivos coinciden con la información a exponer.
- IV. Revisiones bibliográficas de literatura relacionada, en la que se ha realizado una selección previa de la información.
- V. Artículos publicados después del 2000.

3.2.2. Criterios de exclusión

- I. Estudios en un idioma diferente al español o inglés.
- II. Investigaciones cuyas conclusiones sean contradictorias con el resto de la literatura.
- III. Investigaciones realizadas en muestras de agua y sedimentos marinos
- IV. Estudios cuyos objetivos no están relacionados con los objetivos de este trabajo.
- V. Artículos publicados antes del 2000.

3.3. Ecuaciones de búsqueda

Para llevar a cabo la selección de documentos que fueron empleados en la realización de este trabajo, se utilizaron palabras clave relacionadas con el tema del estudio,

conectadas con distintos operadores booleanos como: “AND” para encontrar documentos que contengan varios términos, “OR” para la búsqueda de documentos con los términos de interés, y donde pueden utilizarse sinónimos.

Para organizar las palabras utilizadas se elaboró la tabla 2, en la que se muestran los descriptores y sus respectivos términos y sinónimos, en castellano e inglés, ya que la mayoría de las bases de datos o buscadores están en inglés.

Tabla 2: Descriptores utilizados, sinónimos y su traducción al inglés. Fuente: Elaboración propia.

Descriptor	Términos sinónimos / Palabras relacionadas	Traducción al inglés
Plásticos	Polímeros	Polymers
	Polímeros sintéticos	Synthetic polymers
	Microplásticos (PVC, PS, PC, PET, ABS, PE, HDPE, LDPE, PA)	Microplastics (PVC, PS, PC, PET, ABS, PE, HDPE, LDPE, PA)
	Contaminante	Pollutant / contaminant
Análisis de microplásticos	Extracción de microplásticos / plásticos	Microplastics / plastics extraction
	Digestión ácida (HNO ₃ , HCl, HClO ₄ , H ₂ O ₂)	Acid digestion (HNO ₃ , HCl, HClO ₄ , H ₂ O ₂)
	Digestión alcalina (KOH, NaOH, NaClO)	Alkaline digestion (KOH, NaOH, NaClO)
	Digestión enzimática (proteínasa-K, tripsina, Corolase)	Enzymatic digestion (proteinase-K, trypsin, Corolase)
Organismos marinos	Especies marinas	Marine species / organism
	Biomonitor	Biomonitor
	Vertebrados marinos (teleósteos, reptiles y mamíferos marinos)	Marine vertebrates (teleosts, reptiles and marine mammals)
	Invertebrados marinos (moluscos, crustáceos y equinodermos)	Marine invertebrates (mussels, crustaceans and echinoderms)
	Elasmobranquios	Elasmobranchs
	<i>Scyliorhinus canicula</i>	<i>Scyliorhinus canicula</i>
	Pintarroja	Small spotted catshark

Durante la realización de la búsqueda bibliográfica, se utilizó el apartado de “tema” en la mayoría de las ocasiones. También se utilizó el apartado de “título” para acotar más la búsqueda cuando los documentos obtenidos en primer lugar no estaban relacionados con la búsqueda realizada.

Primero, se realizó una búsqueda general con el objetivo de obtener una visión global de la información y el tema objeto de esta revisión; después se procedió a definir poco a poco la búsqueda en base al objetivo de este trabajo. Para esto se utilizaron diferentes palabras clave, que aparecen recogidas en la tabla 3.

Tabla 3: Ecuaciones de búsqueda generales y específicas utilizadas en las diferentes bases de datos. Fuente: Elaboración propia.

Ecuación de búsqueda	Abreviatura
("Plastic" OR "microplastic") AND ("Pollutant" OR "contaminant") AND ("Marine environment" OR "marine organism")	EBG_1
("Marine environment" OR "marine organism" OR " <i>Scyliorhinus canicula</i> ") AND ("Microplastic digestion" OR "microplastic extraction")	EBG_2
("Microplastic extraction") AND ("Acid digestion" OR "HNO ₃ " OR "HCl" OR "HClO ₄ ") AND ("Marine organism" OR "Marine vertebrates" OR "Marine invertebrates" OR " <i>Scyliorhinus canicula</i> ")	EBS_1
("Microplastic extraction") AND ("Oxidative digestion" OR "H ₂ O ₂ " OR "K ₂ S ₂ O ₈ ") AND ("Marine organism" OR "Marine vertebrates" OR "Marine invertebrates" OR " <i>Scyliorhinus canicula</i> ")	EBS_2
("Microplastic extraction") AND ("Alkaline digestion" OR "KOH" OR "NaOH" OR "NaClO") AND ("Marine organism" OR "Marine vertebrates" OR "Marine invertebrates" OR " <i>Scyliorhinus canicula</i> ")	EBS_3
("Microplastic extraction") AND ("Enzymatic digestion" OR "proteinase-K" OR "trypsin" OR "Corolase") AND ("Marine organism" OR "Marine vertebrates" OR "Marine invertebrates" OR " <i>Scyliorhinus canicula</i> ")	EBS_4

En la primera ecuación de búsqueda general (EBG_1) se introdujeron las palabras clave “microplastic”, “pollutant” y “marine environment” para poder obtener una información genérica sobre el estado de contaminación del medio marino por plásticos y microplásticos, así como los efectos que producen sobre los organismos que lo habitan.

La segunda de búsqueda general (EBG_2) se centró en el ámbito químico y la detección de microplásticos en la biota marina, por lo que se emplearon las palabras clave de “microplastic”, “microplastic extraction”, “microplastic digestion”, “marine organism” y “*Scyliorhinus canicula*” para obtener una visión general de las distintas tipologías de metodologías existentes y empleadas, descartando aquellas aplicadas a muestras de agua y sedimento marino, y seleccionando aquellas aplicadas sobre la biota marina, y a ser posible, sobre *S. canicula*.

Una vez adquirida la visión general, se procedió al uso de las ecuaciones de búsqueda específicas (EBS) para centrar la búsqueda y obtener información más concreta. Las ecuaciones de búsqueda específicas se muestran en la tabla 3. En lo que respecta a los descriptores, se explican a continuación.

En la primera ecuación de búsqueda específica (EBS_1) se utilizaron las palabras: “microplastic”, “acid digestion”, “*Scyliorhinus canicula*”, “marine organism”. Se emplearon estos para focalizar la búsqueda en las metodologías donde se usan los compuestos y soluciones ácidas en la digestión de muestras biológicas.

En la primera ecuación de búsqueda específica (EBS_2) se realizó con objetivo de obtener metodologías donde se usan los compuestos y soluciones oxidativas en la digestión de muestras biológicas. Para ello se utilizaron las palabras: “microplastic”, “oxidative digestion”, “*Scyliorhinus canicula*”, “marine organism”. Se emplearon estos para focalizar la búsqueda en las metodologías donde se usan los compuestos y soluciones ácidas en la digestión de muestras biológicas.

Respecto a la segunda búsqueda específica (EBS_3), puso el centro de atención en las metodologías alcalinas para la extracción de microplásticos. Se utilizaron las palabras clave de “microplastic”, “alkaline digestion”, “*Scyliorhinus canicula*”, “marine organism”.

Se realizó una tercera ecuación de búsqueda específica (EBS_4), pero centrada en las metodologías basadas en el uso de enzimas o extractos enzimáticos en la extracción

de microplásticos y digestión de muestras biológicas. Para ello se utilizaron las palabras clave “microplastic”, “enzimatic digestion”, “*Scyliorhinus canicula*”, “marine organism”.

Tras finalizar la búsqueda, se elaboraron tablas para recoger las publicaciones encontradas y las seleccionadas en cada base de datos, para clasificar las publicaciones por metodología y disolución utilizada, así como para clasificar la cantidad de publicaciones donde se utiliza a *Scyliorhinus canicula* en los estudios. También se realizó un análisis de productividad anual respecto a la cantidad de artículos seleccionados por cada año, dentro del periodo de estudio acotado.

4. RESULTADOS

4.1. Resultados del análisis bibliométrico

En la tabla 4 pueden observarse los resultados obtenidos al realizar la búsqueda bibliográfica con la EBG_1, donde se obtuvieron un total de 43.205 publicaciones científicas en todas las bases de datos utilizadas, de las cuales se seleccionaron 58. Estas publicaciones sirvieron para obtener una visión general del tema a tratar, proporcionando información y contexto histórico sobre los plásticos y microplásticos en el medio marino; así como sus efectos sobre éste.

Tabla 4: Resultados obtenidos con EBG_1.

EBG_1	(Plastic OR microplastic) AND (Pollutant OR contaminant) AND (Marine environment OR marine organism)	
Fuentes	Artículos encontrados	Artículos utilizados
BioOne	612	2
Scopus	513	10
Web of Science	1.213	15
ScienceDirect	2.272	12
Google Scholar	40.700	13
ResearchGate	100	5
Dialnet	8	1
Total	43.205	58

En la búsqueda realizada mediante la EBG_2, aun tratándose de otra búsqueda genérica, puso el foco de atención en aquella información referente a las distintas metodologías de extracción de microplásticos y digestión de matrices orgánicas aplicadas sobre la biota marina, incluyendo aquellos resultados donde se aplicaban sobre la especie de elasmobranquio *Scyliorhinus canicula*. Para ello, se emplearon las palabras clave “marine organism” y “*Scyliorhinus canicula*” como parte de la EBG_2.

Se encontraron en total 662, de las cuales se seleccionaron 29 para el presente trabajo (tabla 5). Cabe mencionar que no se obtuvieron resultados de las bases de datos de BioOne y Dialnet.

Tabla 5: Resultados obtenidos con la EBG_2.

EBG_2 (“Marine enviroment” OR “marine organism” OR “Elasmobranch” OR “Scylliorhinus canicula”) AND (“Microplastic digestion” OR “microplastic extraction”)		
Fuentes	Artículos encontrados	Artículos utilizados
BioOne	0	0
Scopus	3	3
Web of Science	203	6
ScienceDirect	76	3
Google Scholar	267	12
ResearchGate	113	5
Dialnet	0	0
Total	662	29

A través de las ecuaciones de búsqueda específica se buscaba una mayor profundización en metodologías de digestión de muestras biológicas para extracción de microplásticos. Mediante el uso de la EBS_1 se encontró información acerca de las metodologías y protocolos basados en digestiones ácidas, empleados en la extracción de microplásticos de muestras de biota marina.

Tal y como se refleja a continuación, en la tabla 6, se obtuvieron 516 publicaciones en total de las cuales se seleccionaron 27. En la base de datos Dialnet no se obtuvieron resultados, seguramente por deberse a un tema más especializado; y junto a ello, en la base de datos BioOne se obtuvieron un total de 35 resultados, que desgraciadamente, no coincidían con los criterios de inclusión previstos en esta revisión. De la EBS_1 de la base de datos donde se obtuvieron un mayor número de resultados es de Google Scholar, de la cual, se emplearon 10; seguida de ScienceDirect, de la cual se utilizaron 8 pese a que fueron encontradas 306 totales.

Tabla 6: Resultados obtenidos con la EBS_1.

EBS_1 ("Microplastic extraction") AND ("Acid digestion" OR "HNO ₃ " OR "HCl" OR "HClO ₄ ") AND ("Marine organism" OR "Marine vertebrates" OR "Marine invertebrates" OR "Scyliorhinus canicula")		
Fuentes	Artículos encontrados	Artículos utilizados
BioOne	35	0
Scopus	6	2
Web of Science	8	3
ScienceDirect	306	8
Google Scholar	38	10
ResearchGate	123	4
Dialnet	0	0
Total	516	27

De las publicaciones empleadas finalmente con la EBS_1 el 37% procedían de Google Scholar, el 30% de ScienceDirect, un 15% correspondían a ResearchGate, un 11% a Web of Science y el 7% restante a Scopus (figura 5).

RESULTADOS ESB_1

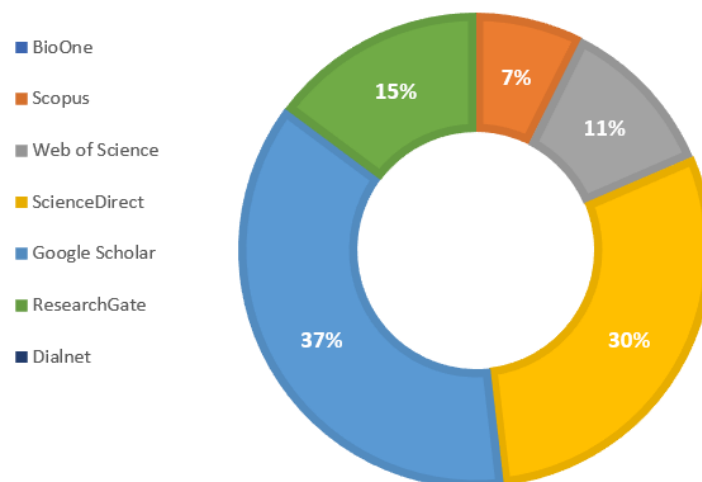


Figura 5: Porcentaje de artículos utilizados de cada base de datos con la EBS_1.

Posteriormente se procedió a utilizar la EBS_2, con objetivo de obtener información acerca de metodologías y protocolos basados en digestiones oxidativas, para ser comparadas y comentadas con las obtenidas en la EBS_1.

Tabla 7: Resultados obtenidos con la EBS_2.

EBS_2 (“Microplastic extraction”) AND (“Oxidative digestion” OR “H ₂ O ₂ ” OR “K ₂ S ₂ O ₈ ”) AND (“Marine organism” OR “Marine vertebrates” OR “Marine invertebrates” OR “ <i>Scylliorhinus canicula</i> ”)		
Fuentes	Artículos encontrados	Artículos utilizados
BioOne	0	0
Scopus	1	1
Web of Science	1	0
ScienceDirect	4	3
Google Scholar	33	9
ResearchGate	60	5
Dialnet	0	0
Total	159	18

Tras su uso (tabla 7), se obtuvo una cantidad de publicaciones encontradas considerablemente menor frente a la EBS_1, con 159 publicaciones totales; de las cuales se seleccionaron 18. Tal y como sucedió con la EBS_1, no se obtuvieron resultados de los buscadores Dialnet y BioOne; seguramente por la misma razón mencionada anteriormente. Destaca el hecho de que se obtuviera un único resultado en la base de datos de Web of Science, el cual no fue seleccionado al tratarse de un estudio realizado en algas. La mayor parte de las publicaciones seleccionadas en esta búsqueda procedían de Google Scholar.

RESULTADOS ESB_2

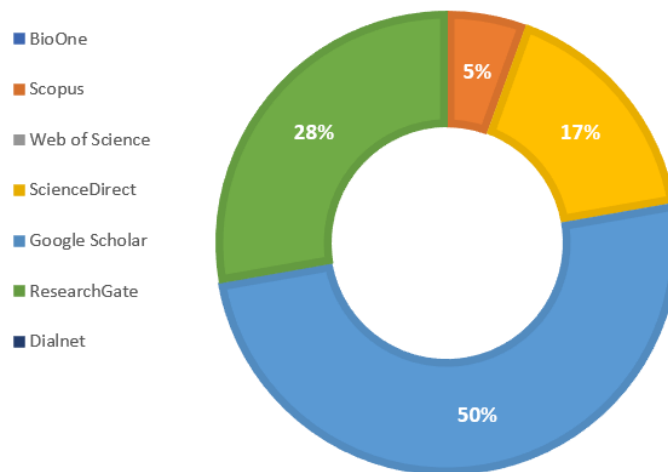


Figura 6: Porcentaje de artículos utilizados de cada base de datos con la EBS_2.

El 50% total de las publicaciones que se emplearon en la EBS_2 han sido encontradas en la base de datos de Google Scholar, seguida de ReserchGate (28%), ScienceDirect (17%) y Scopus (5%); tal y como se refleja en la figura 6.

A continuación, se procedió a emplear la EBS_3, con la cual se obtendría la información necesaria sobre las metodologías de digestión y extracción de microplásticos alcalinas. En la tabla 8 puede observarse los resultados obtenidos tras aplicar dicha ecuación de búsqueda, destacando que son más cercanos a los obtenidos con la EBS_1. Con 304 publicaciones encontradas, esto refleja que tanto las metodologías ácidas y alcalinas son las más reconocidas y utilizadas, punto que será desarrollado más en adelante. Fueron seleccionadas un total 32 publicaciones de las encontradas mediante la EBS_3. Tal y como puede observarse en los resultados de la ESB_1, tampoco se obtuvieron publicaciones a poder emplear en las bases de datos de BioOne y Dialnet, probablemente por los mismos motivos.

Tabla 8: Resultados obtenidos con la EBS_3.

(“Microplastic extraction”) AND (“Alkaline digestion” OR “KOH” OR “NaOH” OR “NaClO”) AND (“Marine organism” OR “Marine vertebrates” OR “Marine invertebrates” OR “Scyliorhinus canicula”)		
EBS_3		
Fuentes	Artículos encontrados	Artículos utilizados
BioOne	0	0
Scopus	7	3
Web of Science	2	2
ScienceDirect	145	12
Google Scholar	53	11
ResearchGate	97	4
Dialnet	0	0
Total	304	32

En este caso, del buscador en el que se obtuvo un mayor número de publicaciones utilizadas fue de ScienceDirect, con un 38% del total de publicaciones utilizadas, frente al 34% de Google Scholar, un 13% de ResearchGate, un 9% pertenecientes a Scopus, y el 6% restante a Web of Science (figura 7).

RESULTADOS ESB_3

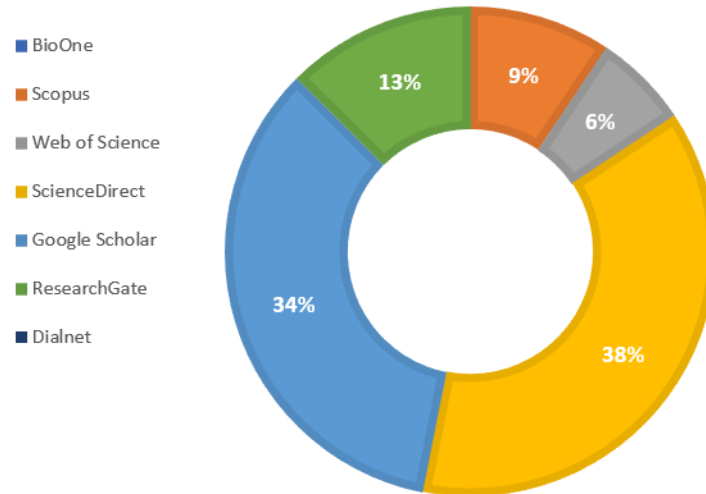


Figura 7: Porcentaje de artículos utilizados de cada base de datos con la EBS_3.

Finalmente se empleó la EBS_4, la cual permitió obtener información de metodologías y protocolos basados en el uso de enzimas o extractos enzimáticos para digerir muestras biológicas. Tras realizar la búsqueda (tabla 9), cabe destacar que fue de la que menor resultados se obtuvieron principalmente, encontrando un total de 149 publicaciones, de las cuales sólo fueron empleadas 13.

Tabla 9: Resultados obtenidos con la EBS_4.

(“Microplastic extraction”) AND (“Enzimatic digestion” OR “proteinase-K” OR “trypsin” OR “Corolase”) AND EBS_4 (“Marine organism” OR “Marine vertebrates” OR “Marine invertebrates” OR “Elasmobranchs” OR “Scyliorhinus canicula”)		
Fuentes	Artículos encontrados	Artículos utilizados
BioOne	0	0
Scopus	0	0
Web of Science	2	2
ScienceDirect	8	4
Google Scholar	35	5
ResearchGate	104	2
Dialnet	0	0
Total	149	13

Cabe mencionar que, en esta ocasión, las bases de datos BioOne, Dialnet y Scopus no obtuvieron resultados al aplicar la EBS_4. Para la EBS_3, el mayor número de publicaciones utilizadas fue de Google Scholar, con un 39% del total de publicaciones utilizadas, muy cercano a las publicaciones utilizadas de ScienceDirect, con un 31%, un 15% a ResearchGate, y el último 15% restante a Web of Science (figura 8).

RESULTADOS ESB_4

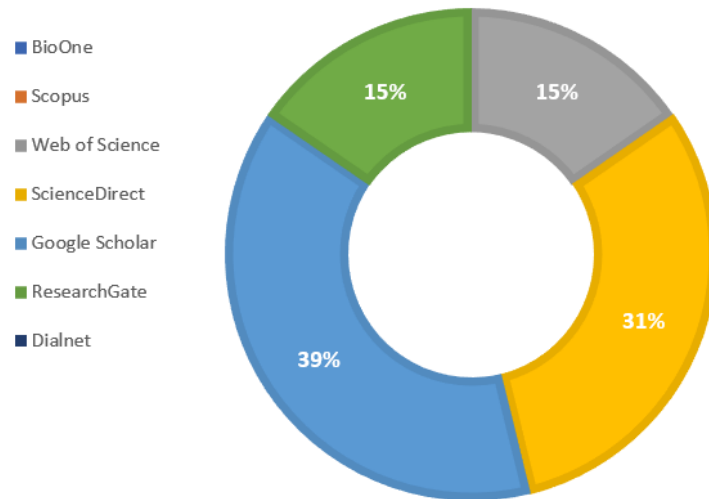


Figura 8: Porcentaje de artículos utilizados de cada base de datos con la EBS_3.

Cabe mencionar que de todas las publicaciones obtenidas relacionadas con metodologías y protocolos de digestión de muestras de biota marina para la extracción de microplásticos, mediante las EBG_2 y las EBS_1, 2, 3 y 4, se han obtenido un total de 119 publicaciones, muchas de las cuales son comunes en las búsquedas de las EBS. Restando estas búsquedas repetidas, se obtiene un total de 78 publicaciones empleadas con las ecuaciones de búsqueda específicas y la EBG_2.

A continuación, la figura 9 muestra la producción científica anual, dentro del período acotado para el presente trabajo estudiado. Destaca que los artículos empleados son de estudios realizados a partir del 2013, previamente no se encontró ningún estudio previo que se ajustara a los criterios de inclusión utilizando las ecuaciones de búsqueda específicas y la EBG_2. También puede observarse que en el año 2019 sucede un considerable aumento en la producción científica, con 32 publicaciones, superando con creces al resto de años, donde, por ejemplo, en los años 2016, 2017 y 2018 se mantiene una producción más constante.

Productividad científica

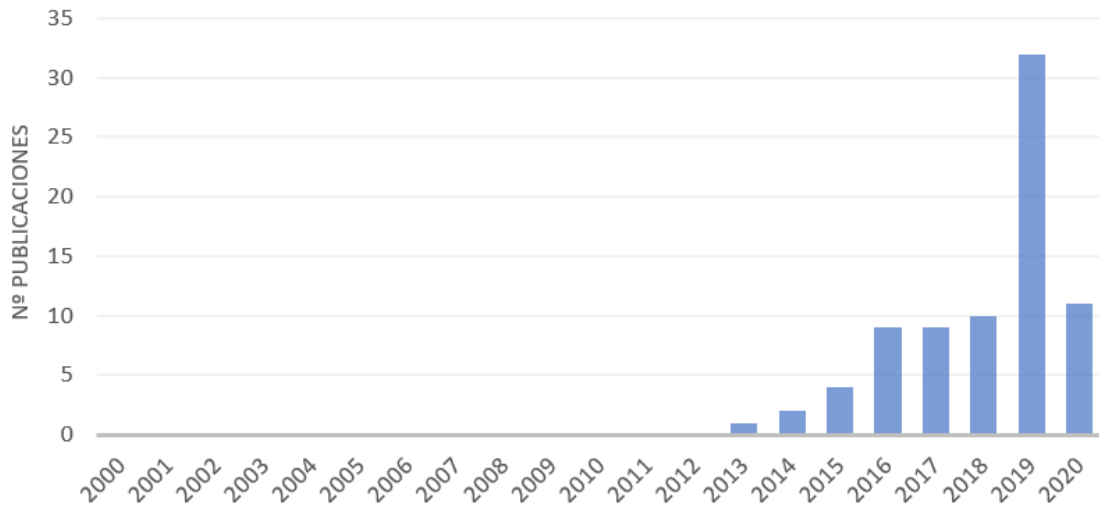


Figura 9: Productividad científica anual.

4.1.1. Metodologías de digestión

La figura 10, que se muestra a continuación, refleja los resultados obtenidos tras el uso de las ecuaciones de búsqueda respecto a las metodologías empleadas en la digestión de muestras biológicas para la extracción de microplásticos. Cabe mencionar que diversas publicaciones seleccionadas para el presente trabajo empleaban dos o más metodologías distintas en el proceso; principalmente entre metodologías de tipo ácida y alcalina, con objetivo de valorar su capacidad de digerir la matriz orgánica y la tasa de recuperación de polímeros, de ahí el elevado número representativo de ambas metodologías

Resultados metodológicos

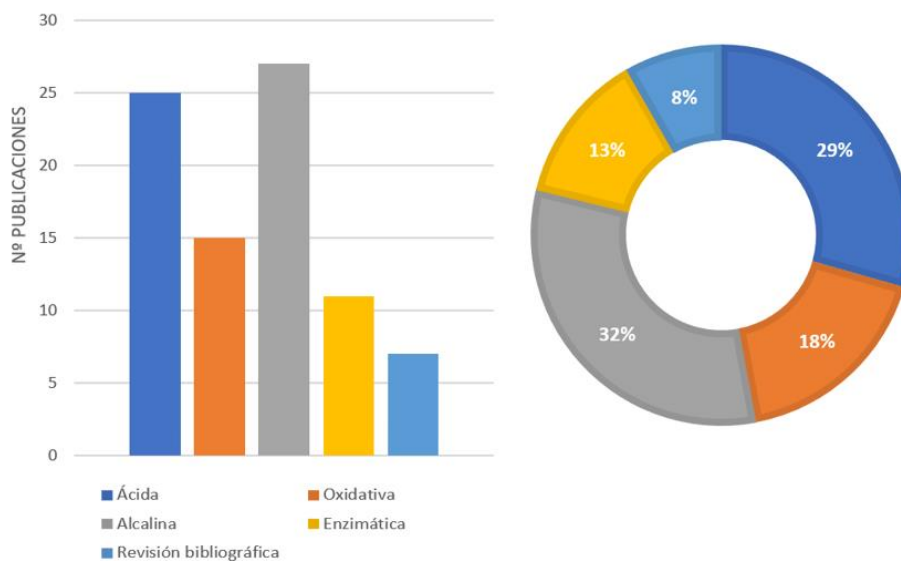


Figura 10: Resultados del uso de las distintas metodologías de digestión.

Tal y como se observa en la figura 10, la metodología predominante en los artículos seleccionados es la de tipo alcalina, utilizada en un 32% de las ocasiones. Muy seguida de ésta, se encuentran las metodologías ácidas, representando un 29% del total. En tercer lugar, se encuentran las metodologías oxidativas, representando un 18% de las publicaciones seleccionadas.

Como cuarto grupo, se encuentran las metodologías enzimáticas, con un 13% de las investigaciones totales, debido principalmente al elevado coste que conlleva la obtención de estas enzimas o extractos enzimáticos en comparación con los productos empleados en las otras metodologías. En último lugar, destaca la presencia del grupo denominado “revisión bibliográfica”, pues engloba a aquellas investigaciones y pruebas químicas o estudios bibliográficos, en los cuales se testean varias metodologías, de los grupos mencionados anteriormente, con objetivo de valorar la que presenta mejores resultados en cuanto a parámetros como matriz digerida y/o daños producidos a los polímeros principalmente.

De entre las metodologías mencionadas anteriormente (ácida, alcalina, oxidativa y enzimática), se emplearon un total de 28 compuestos o productos en las disoluciones con las que se realizaban las digestiones de las muestras biológicas, tractos gastrointestinales en la mayoría de los casos.

Éstos han sido clasificados en 3 grupos tal y como muestra la tabla 10. Los más empleados en la extracción de microplásticos fueron clasificados como “comunes” (en verde) si aparecían en más de 10 publicaciones, si aparecían entre 10 y 2 publicaciones, se clasificaban como “ocasionales” (en amarillo), y finalmente, los menos utilizados fueron clasificados como “escasos” (en rojo) si aparecían en 1 sola publicación.

Tabla 10: Productos y disoluciones utilizados en las publicaciones seleccionadas

Grupos					
Comunes		Ocasionales		Escasos	
KOH	28/78	HNO ₃ :HClO ₄	7/78	HClO ₄	1/78
HNO ₃	24/78	Proteasas	7/78	Fe ²⁺ :SO ₄ :H ₂ O ₂	1/78
H ₂ O ₂	19/78	HCl:HNO ₃	3/78	H ₂ O ₂ :HCl	1/78
NaOH	13/65	H ₂ O ₂ :HNO ₃	3/78	KOH:T20	1/78
HCl	12/78	Tripsina	3/78	KOH:HNO ₃	1/78
Proteinasa-K	11/78	H ₂ O ₂ :KOH	3/78	NaOH:HNO ₃ :H ₂ O ₂	1/78
		H ₂ SO ₄	2/78	K ₂ S ₂ O ₈ :NaOH	1/78
		H ₂ O ₂ :Fe ²⁺	2/78	NaI	1/78
		Corolase 7089	3/78	Colagenasa	1/78
		Enzima pancreática	2/78	Papaína	1/78
				Biozym F	1/78
				Biozym SE	1/78

4.1.1.1. Comunes

Tal y como muestra la figura 12, dentro del grupo denominado como “comunes” domina la presencia de 2 compuestos utilizados en las disoluciones de digestión. Como compuesto más empleado se encuentra el KOH (representado en un 26% respecto al total), seguido del HNO₃ (23%), el H₂O₂ (18%), el NaOH (con un 12%), el HCl (11%) y la proteinasa-K (un 10%).

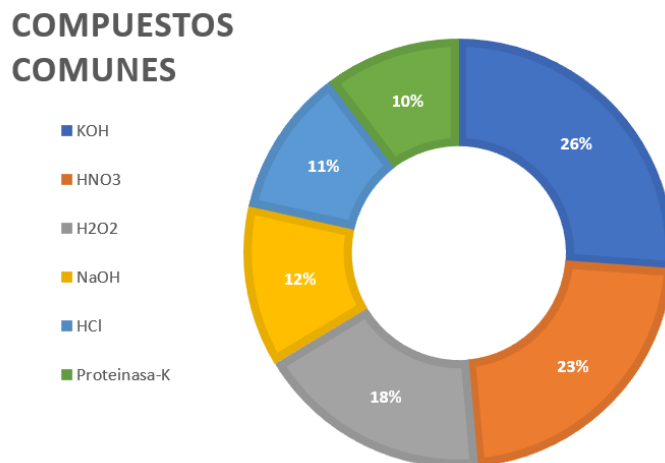


Figura 11: Compuestos clasificados como “comunes” en los artículos empleados.

El más utilizado corresponde al KOH encontrado en 28 de las 78 publicaciones empleadas. Corresponde al también al más abundante dentro de las metodologías alcalinas, siendo una de las más prometedoras debido a la ausencia de degradación sustancial de los polímeros junto a una digestión óptima en muestras con alto contenido proteico en los tejidos, como tractos gastrointestinales (Dehaut *et al.*, 2016; Lusher, 2017; Miller *et al.*, 2017; Enders *et al.*, 2020). La tabla 11 mostrada a continuación recoge cómo la disolución de KOH afecta a los distintos polímeros, degradando únicamente el CA (Dehaut *et al.*, 2016).

Tabla 11: Resultados de distintos polímeros testeados en disoluciones alcalinas. Fuente: Dehaut *et al.*, 2016.

Polímeros	Resultados (KOH 10%)	Resultados (NaOH 10%)
CA	X	X
ePS	NA	NA
HDPE	/	/
LDPE	/	/
PA-12	/	/
PA-6	/	/
PC	/	X
PET	/	X
PMMA	/	/
PP	/	/
PS	/	/
PTFE	/	/
PUR	/	/
PVC	/	/

X: Degradación del polímero o problemas de identificación. **NA:** Cambios en la forma y tamaño. **/:** Correcta identificación y análisis.

El segundo compuesto más empleado fue el HNO₃, siendo presente en 24 de las 78 publicaciones encontradas. Es caracterizado por ser un fuerte oxidante que disuelve rápidamente de material biogénico, con una eficacia de digestión muy elevada y pérdida de peso del tejido biológico mayores al 98% de media, pero que causa un daño considerable a los polímeros, llegando incluso a degradarlos (Dehaut *et al.*, 2016; Lusher, 2017; Naidoo *et al.*, 2017). Dehaut *et al.*, (2016) demostró que dicho protocolo causa la degradación de polímeros como PA-12 (nylon 12) (figura 12 a, b), acompañada de una disminución en el peso de las partículas; y muestras de amarillamiento (Figura 12 c, d) observadas para todos los polímeros.

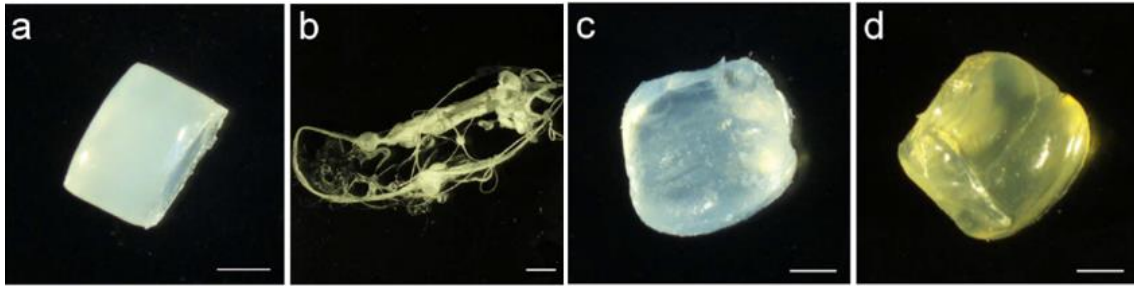


Figura 12: Resultados de digestión con HNO_3 . **a,c**: Fibras originales. **b,d**: Fibras post-digestión. Fuente: Dehaut *et al.*, 2016.

Seguidamente destaca el uso de H_2O_2 en la digestión de las matrices biológicas, en 19 de las 78 publicaciones totales. Su uso destaca principalmente por su relación coste-beneficio, pues presenta una alta efectividad en la digestión de tejido orgánico aun causando daños menores sobre algunos polímeros (PET y PP principalmente) (Claessens *et al.*, 2013; Vandermeersch *et al.*, 2015; Lusher *et al.*, 2016; Liu, 2020). Si bien es una excelente metodología de digestión, presenta ciertas fallas como su menor capacidad de digestión en comparación con otras metodologías que también dañan polímeros en el proceso. Claessens *et al.* (2013) lo muestra en su estudio comparando la efectividad de una disolución de H_2O_2 frente a una de HNO_3 en muestras de tejido de blando de mejillón (tabla 12).

Tabla 12: Valores que representan el porcentaje de tejido blando de mejillón restante la digestión. Fuente: Claessens *et al.*, 2013.

	Temperatura de digestión	
	24h a 60°C	1h a 60 °C / 1 h a 100 °C
HNO_3		
Frío	0.48 (± 0.07)	0.26 (± 0.06)
Caliente	0.35 (± 0.07)	0.15 (± 0.05)
H_2O_2		
Frío	1.49 (n.d.)	0.45 (n.d.)
Caliente	1.43 (n.d.)	1.35 (n.d.)

En cuanto a los últimos compuestos dentro de este apartado, se encuentran el NaOH, el HCl, y la proteinasa-K; los cuales, de las 78 publicaciones totales, se han encontrado en 13, 12 y 11 respectivamente. Las soluciones de NaOH son óptimas en las digestiones alcalinas, pese a que, en contraposición con el KOH, ésta presenta un impacto mayor en ciertos polímeros (PA, PVC y PE), tal y como se ha mostrado anteriormente en la tabla 11 (Dehaut *et al.*, 2016; Lusher, 2017; Miller *et al.*, 2017; Liu, 2020). Los tratamientos con HCl resultan ser muy efectivo en la digestión orgánica, pero siguen siendo agresivos ante los polímeros, que sufren degradación (Dehaut *et al.*, 2016;

Lusher, 2017; Miller *et al.*, 2017). Por último, la proteinasa-K se caracteriza por su especificidad ante ciertos compuestos orgánicos (proteínas, lípidos y/o carbohidratos), otorgando resultados ceca del el 97% del material orgánico digerido, sin afectar a la estructura de los polímeros (Dehaut *et al.*, 2016; Miller *et al.*, 2017; Liu, 2020).

4.1.1.2. Ocasionales

En el grupo denominado “ocasionales”, destacan por encima del resto la solución de $\text{HNO}_3:\text{HClO}_4$, con un 20% de representatividad dentro de este grupo, al igual que las enzimas proteasas, tal y como se aprecia en la figura 13. El resto de los integrantes, los cuales serán comentados más en adelante, se encuentran en proporciones muy similares.

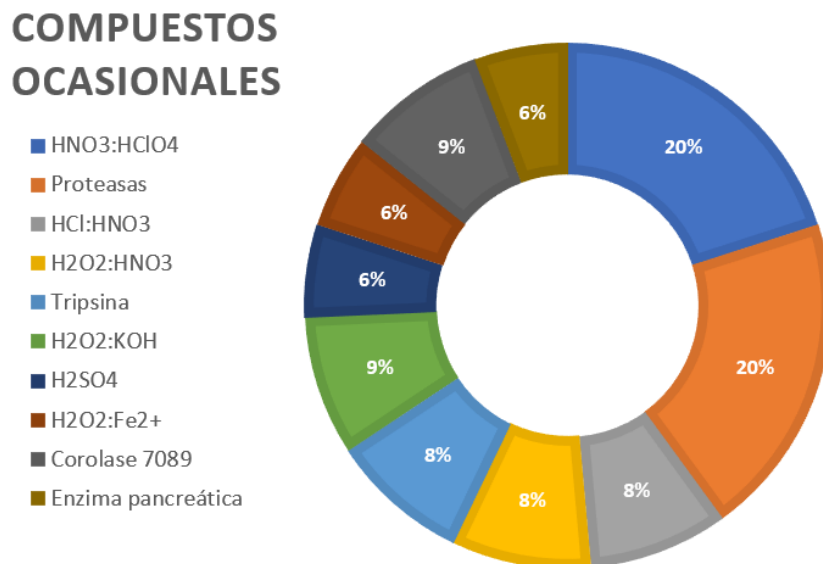


Figura 13: Compuestos clasificados como “ocasionales” en los artículos empleados.

La solución $\text{HNO}_3:\text{HClO}_4$, actualmente catalogada como “protocolo ICES” (ICES, 2015; Dehaut *et al.*, 2016; Enders *et al.*, 2016), presente en 7 de las 78 publicaciones finales, es una opción utilizada ya que tiene un carácter ácido muy fuerte, capaz de digerir completamente toda la matriz orgánica tras el proceso; pero es la metodología que más daño causa a los polímeros (Claessens *et al.*, 2013; Vandermeersch *et al.*, 2015). Seguida de ésta, se encuentran las proteasas, que aparecen en 4 de las 65 publicaciones, cuyo motivo principal de uso es debido a que catalizan la descomposición de cadenas proteicas. Para su correcto funcionamiento, necesitan de las condiciones óptimas de pH y temperatura esencialmente durante la digestión de la muestra (Desforges *et al.*, 2015; Courtene-Jone *et al.*, 2017).

Seguidamente, se encuentra la mezcla de HCl:HNO₃, utilizada dadas sus características ácidas para disolver de forma eficaz los tejidos biológicos. Si bien combina dos potentes ácidos anteriormente mencionados (HCl y HNO₃), su eficacia en la digestión no difiere en exceso y además degradan gravemente los polímeros (Desforges *et al.*, 2015).

Otro compuesto, también presente en 3 de las 78 publicaciones empleadas, fue la mezcla de H₂O₂:HNO₃, empleada principalmente en la digestión de tejidos blandos (moluscos, por ejemplo) con una eficacia ligeramente menor frente a otras metodologías ácidas (Desforges *et al.*, 2015).

La Corolase 7089, enzima obtenida de cultivos del *Bacillus subtilis*, se caracteriza por activarse a valores de pH entre 6 y 9, permitiendo su uso en agua sin la adición de un tampón. Muy eficaz en la digestión de matrices orgánicas y manteniendo los polímeros sin daños, permitiendo una buena tasa de recuperación de PET, HDPE, PVC, e incluso PA (Catarino *et al.*, 2017).

También se encuentra presente el uso de la enzima Tripsina (representando un 8% respecto del total), la cual destaca por tiempos cortos de digestión de (30 min) y no causa graves alteraciones a PET, HDPE, PVC, PP, PS y PA; aun así, el efecto sobre el resto de polímeros es desconocido (Courtene-Jones *et al.*, 2016; Miller *et al.*, 2017). Junto a la anterior, también está presente, la solución de H₂O₂:KOH, la cual resulta ser eficaz en la digestión de los tejidos biológicos; pero causando ciertos daños en polímeros de estructura menos resistente (Dehaut *et al.*, 2016).

El resto de los compuestos pertenecientes al grupo de “ocasionales” se encuentran en 2 de las 65 publicaciones totales. Estos son el H₂O₂:Fe²⁺, que resulta ser eficaz en digestión de materia orgánica y no presenta degradación de los polímeros plásticos si el pH de la disolución de mantiene controlado (Liu, 2020), el H₂SO₄, muy eficaz respecto a la digestión de muestras biológicas al ser uno de los compuestos más ácidos, pero causa un gran daño a los polímeros, llegando a degradar por completo algunos (Courtene-Jone *et al.*, 2017).

También se encuentran en este último apartado a las enzimas pancreáticas, cuyo uso es muy reciente y el cual está dando grandes resultados, con una eficacia de hasta el 97,7% de tejido digerido en pequeños invertebrados marinos (Gutovskaia, 2019); y las celulasas-lipasas, metodologías basadas en distintas enzimas de esta índole, capaces

de degradar fácilmente lípidos y celulosa (empleada en gran medida en fitoplancton) en condiciones de temperatura y pH óptimas (Löder *et al.*, 2017).

4.1.1.3. Escasos

Por último, están aquellos compuestos que tan solo aparecen en 1 artículo, generalmente en el caso de revisiones bibliográficas o en optimizaciones de metodologías de extracción de microplásticos donde son descartados al inicio del experimento.

Dada su poca utilidad, dichos compuestos han sido recopilados en la tabla 13, mostrada a continuación, donde se describen las características genéricas de los motivos por los cuales, según la bibliografía consultada para este trabajo, no son utilizados en protocolos de extracción de microplásticos en matrices orgánicas.

Tabla 13: Tabla resumen de las disoluciones y compuestos "escasos".

Compuestos "escasos"		
Compuesto	Características	Referencia
HClO ₄	Compuesto muy agresivo ante los polímeros, daña incluido aquellos de estructura más resistente	(a,b)
Fe ²⁺ :SO ₄ :H ₂ O ₂	Diferencias muy significativas en la tasa de recuperación de polímeros	(c)
H ₂ O ₂ :HCl	Solución muy ácida, degrada completamente los polímeros menos resistentes	(a)
KOH:T20	No aporta mejores resultados que la digestión de KOH (10%), peor relación coste-beneficio	(a)
KOH:HNO ₃	Buena recuperación de microplásticos salvo el caso de PA, baja relación coste-beneficio frente a disoluciones de KOH o HNO ₃	(d)
NaOH:HNO ₃ :H ₂ O ₂	Generación de espuma en el proceso de digestión, mala tasa de recuperación de polímeros	(a)
K ₂ S ₂ O ₈ :NaOH	Fuerte degradación de CA, junto dificultades ante la cristalización del K ₂ S ₂ O ₈	(b)
NaI	Tasas de recuperación bajas, tan sólo del 87%, y únicamente verificado para PS, PA y PVC	(a)
Colagenasa	Exclusividad, eficaz únicamente ante el colágeno e incapaz de digerir otros tipos de matrices orgánicas	(e)
Papaína	Poca eficiencia (70%) al digerir tejidos orgánicos respecto a otras metodologías enzimáticas	(a,f)
Biozym F	Necesidad de mantener constantes las condiciones experimentales en el proceso digestivo	(h)
Biozym SE	Necesidad de mantener constantes las condiciones experimentales en el proceso digestivo	(h)

a: Lusher, 2017; b: Dehaut *et al.*, 2016; c: Munno *et al.*, 2017; d: Schirinzi *et al.*, 2020; e: Courtene-Jones *et al.*, 2017; f: Löder *et al.*, 2017; h: Piarull *et al.*, 2019

4.1.2. Grupos zoológicos empleados

Dentro de la selección de artículos utilizados para el presente trabajado, se utilizan un total de 185 especies de animales, de distintos grupos y filos como, teleósteos, elasmobranquios, moluscos, crustáceos, mamíferos marinos, reptiles marinos, anélidos, equinodermos y cnidarios. La figura 14 muestra la cantidad de publicaciones en las que aparecen dichos grupos zoológicos, en la cual puede observarse que los grupos de teleósteos y moluscos son los más empleados en metodologías de extracción de microplásticos.



Figura 14: Producción científica de cantidad de publicaciones respecto a grupos zoológicos.

4.1.2.1. Teleósteos

El grupo de los teleósteos destaca por ser el más numeroso, con 124 especies estudiadas en los 25 artículos totales (Avio *et al.*, 2015; Budimir *et al.*, 2017; Naidoo *et al.*, 2017; Karlsson *et al.*, 2017; Roch and Brinker, 2017; Digka *et al.*, 2018; Nelms *et al.*, 2018; Wieczorek *et al.*, 2018; Azizah and Saragih, 2019; Bucol *et al.*, 2019; Chan *et al.*, 2019; Frapiccini *et al.*, 2019; Giani *et al.*, 2019; Hossain *et al.*, 2019; Karbalaei *et al.*, 2019; Naidoo *et al.*, 2019; Sun *et al.*, 2019; Verlaan *et al.*, 2019; Zhao *et al.*, 2019; Zhu *et al.*, 2019; Barboza *et al.*, 2020; Bianchi *et al.*, 2020; Garcés-Ordóñez *et al.*, 2020; Neeltje de Vriese *et al.*, 2020; Schirinzi *et al.*, 2020) donde se han empleado estos organismos (figura 15).

Las especies más utilizadas en los artículos seleccionados son *Mullus barbatus* presente en 4 publicaciones (Avio *et al.*, 2015; Bellas *et al.*, 2016; Digka *et al.*, 2018; Giani *et al.*, 2019), seguidas de *Merluccius merluccius*, la cual aparece en 3 publicaciones (Avio *et al.*, 2015; Bellas *et al.*, 2016; Giani *et al.*, 2019) y *Sardina*

pilchardus presente también en 3 publicaciones (Avio et al., 2015; Digka et al., 2018; Hossain et al., 2019).

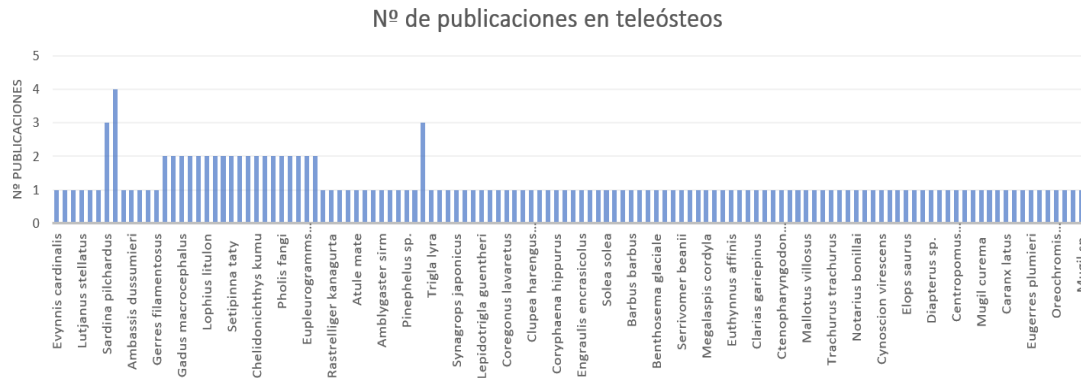


Figura 15: Número de publicaciones en las cuales aparece cada especie de teleósteos.

Respecto a las metodologías de digestión utilizadas en teleósteos (figura 16) puede observarse que las metodologías alcalinas basadas en el uso de KOH, presente en 10 publicaciones (Bellas et al., 2016; Budimir et al., 2017; Roch and Brinker, 2017; Wieczorek et al., 2018; Bucol et al., 2019; Giani et al., 2019; Frapiccini et al., 2019; Karbalaei et al., 2019; Verlaan et al., 2019; Barboza et al., 2020; Neeltje de Vriese et al., 2020) y las ácidas basadas en el uso de HNO₃ que está presente en 8 publicaciones (Avio et al., 2015; Naidoo et al., 2017; Roch and Brinker, 2017; Chan et al., 2019; Sun et al., 2019; Zhao et al., 2019; Bianchi et al., 2020; Schirinzi et al., 2020).

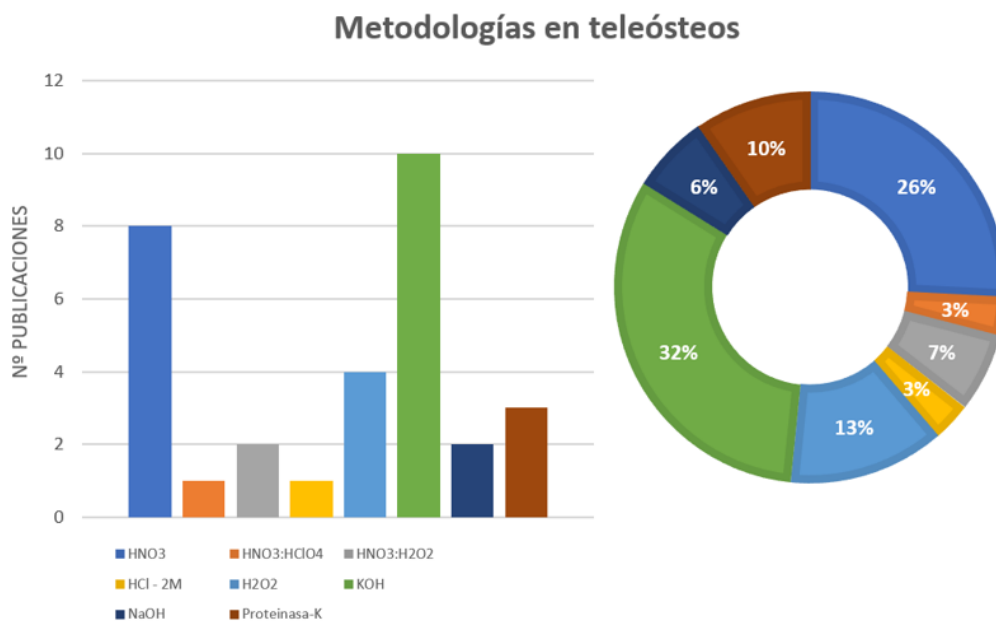


Figura 16: Metodologías de digestión empleadas en teleósteos.

La tercera metodología de digestión más utilizada en este grupo zoológico corresponde a la basada en el uso de H₂O₂, presente en 4 publicaciones y representando un 13% del total (Avio *et al.*, 2015; Digka *et al.*, 2018; Hossain *et al.*, 2019; Bianchi *et al.*, 2020) y la metodología enzimática basada en la proteinasa-K, la cual fue reportada en tres publicaciones (Karlsson *et al.*, 2017; Nelms *et al.*, 2018; Naidoo *et al.*, 2020).

4.1.2.2. Moluscos

Los moluscos se encuentran como el segundo grupo zoológico con más relevancia en la selección de artículos utilizados, con 29 especies estudiadas (figura 17) en 22 publicaciones seleccionadas (Li *et al.*, 2015; Griet *et al.*, 2015; Catarino, 2016; Courtene-Jones *et al.*, 2016; Davidson and Dudas, 2016; Catarino, 2017; Karlsson *et al.*, 2017; Lusher *et al.*, 2017; Digka *et al.*, 2018; Phuong *et al.*, 2018; Jin-Feng *et al.*, 2018; Abidli *et al.*, 2019; Arossa *et al.*, 2019; Chae and An, 2019; Fernández-Severini *et al.*, 2019; Graham *et al.*, 2019; Keisling *et al.*, 2019; Naidu, 2019; Reguera *et al.*, 2019; Thiele *et al.*, 2019; von Friesena *et al.*, 2019; Webb *et al.*, 2019).

La especie de más utilizada es el *Mytilus edulis*, la cual es presente en 8 publicaciones (Griet *et al.*, 2015; Catarino, 2016; Courtene-Jones *et al.*, 2016; Catarino, 2017; Karlsson *et al.*, 2017; Lusher *et al.*, 2017; Phuong *et al.*, 2018; Reguera *et al.*, 2019)

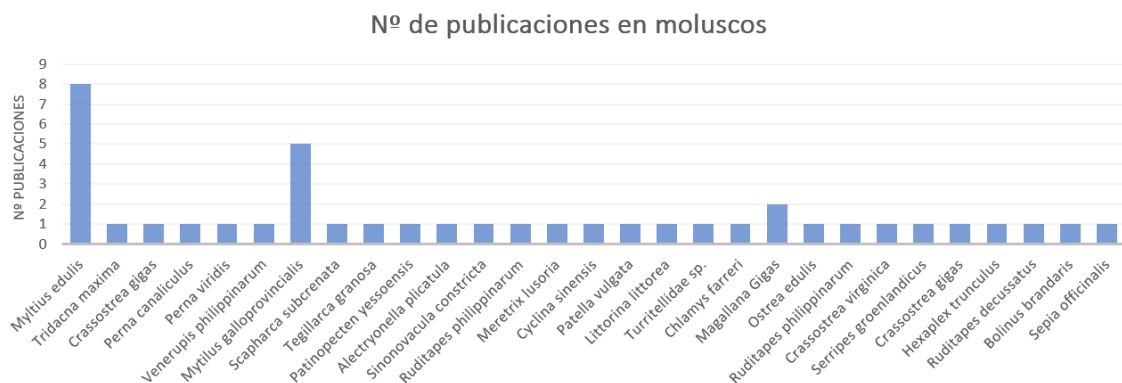


Figura 17: Número de publicaciones en las cuales aparece cada especie de moluscos.

Seguida de ésta, cabe mencionar que la segunda más empleada en estas investigaciones corresponde a *Mytilus galloprovincialis*, utilizada en 5 publicaciones (Griet *et al.*, 2015; Li *et al.*, 2015; Digka *et al.*, 2018; Jin-Feng *et al.*, 2018; Abidli *et al.*, 2019).

En cuanto a las metodologías de digestión utilizadas en este grupo de organismos, tal y como puede observarse en la figura 18, destaca sobremanera el uso de HNO₃ en el proceso de digestión para la extracción de microplásticos. El HNO₃ es presente en 7 publicaciones (Catarino, 2017; Phuong *et al.*, 2018; Arossa *et al.*, 2019; Davidson and

Dudas, 2016; Fernández-Severini *et al.*, 2019; Naidu, 2019; Webb *et al.*, 2019), representando un 22% respecto al total de las metodologías empleadas en moluscos. Seguidamente destacan aquellas basadas en el uso de KOH, presente en 6 publicaciones consultadas (Lusher *et al.*, 2017; Jin-Feng *et al.*, 2018; Abidli *et al.*, 2019; Keisling *et al.*, 2019; Thiele *et al.*, 2019; von Friesena *et al.*, 2019) y a su vez, aquellas basadas en H₂O₂, también en 6 publicaciones (Li *et al.*, 2015; Digka *et al.*, 2018; Jin-Feng *et al.*, 2018; Chae and An, 2019; Philip *et al.*, 2019; Thiele *et al.*, 2019); ambas con un 18% de representatividad respecto al total.

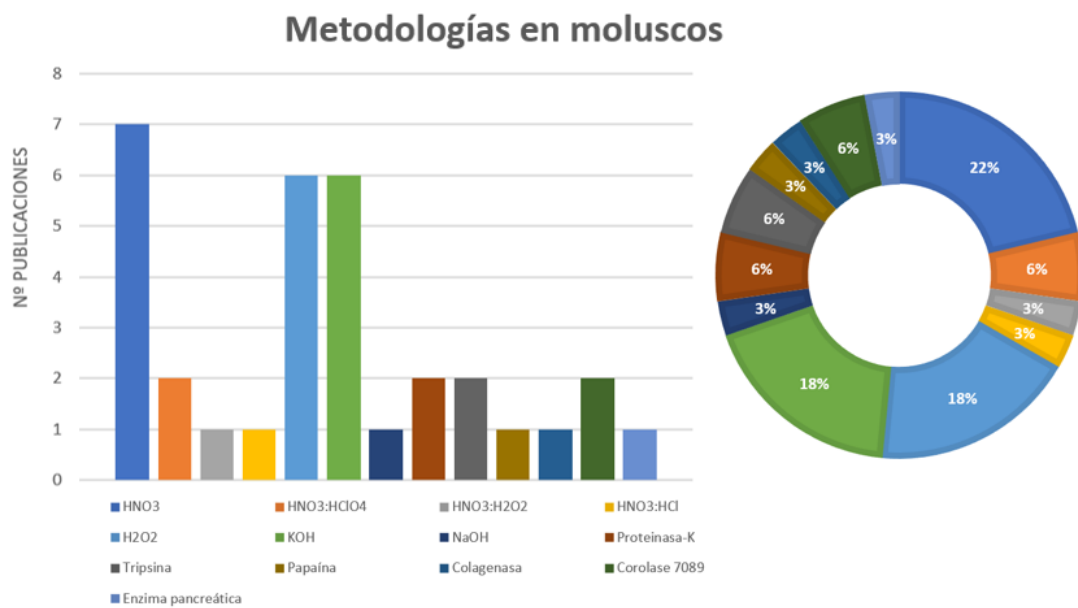


Figura 18: Metodologías de digestión empleadas en moluscos.

4.1.2.3. Crustáceos

En referencia al grupo de los crustáceos, tan sólo 14 publicaciones han realizado estudios con estos organismos (Cole *et al.*, 2014; Elijah-Nathaniel, 2014; Desforges *et al.*, 2015; Devriese *et al.*, 2015; Karlsson *et al.*, 2017; Löder, *et al.*, 2017; Wang and Wang, 2018; Cau *et al.*, 2019; Gutovskaia, 2019; Hossain *et al.*, 2019; Piarull *et al.*, 2019; von Friesena *et al.*, 2019; Hará *et al.*, 2020; Neeltje de Vriese *et al.*, 2020), recogiendo un total de 15 especies distintas, tal y como puede apreciarse en la figura 19.

De entre los artículos empleados, destaca la presencia de 3 especies, presentes en 2 artículos cada una de éstas, siendo *Euphausia pacifica* (Desforges *et al.*, 2015; Löder, *et al.*, 2017), *Crangon crangon* (Devriese *et al.*, 2015; Wang and Wang, 2018) y *Nephrops norvegicus* (Wang and Wang, 2018; Hará *et al.*, 2020).



Figura 19: Número de publicaciones en las cuales aparece cada especie de crustáceos.

Respecto a las metodologías de digestión utilizadas en crustáceos para la extracción de microplásticos, como puede verse en la figura 20, no se ha encontrado una metodología que predomine más que el resto. Las digestiones mediante el uso de H₂O₂ se han encontrado en 5 estudios distintos (Elijah-Nathaniel, 2014; Desforges *et al.*, 2015; Karlsson *et al.*, 2017; Cau *et al.*, 2019; Hossain *et al.*, 2019). Aquellas basadas en el uso HNO₃ se han reportado en 4 publicaciones (Elijah-Nathaniel, 2014; Desforges *et al.*, 2015; Karlsson *et al.*, 2017; Hará *et al.*, 2020); y aquellas alcalinas basadas en KOH, en 3 publicaciones (Piarull *et al.*, 2019; Hará *et al.*, 2020; Neeltje de Vriese *et al.*, 2020). Estas tres metodologías constituyen las de mayor relevancia encontradas en el grupo de crustáceos.

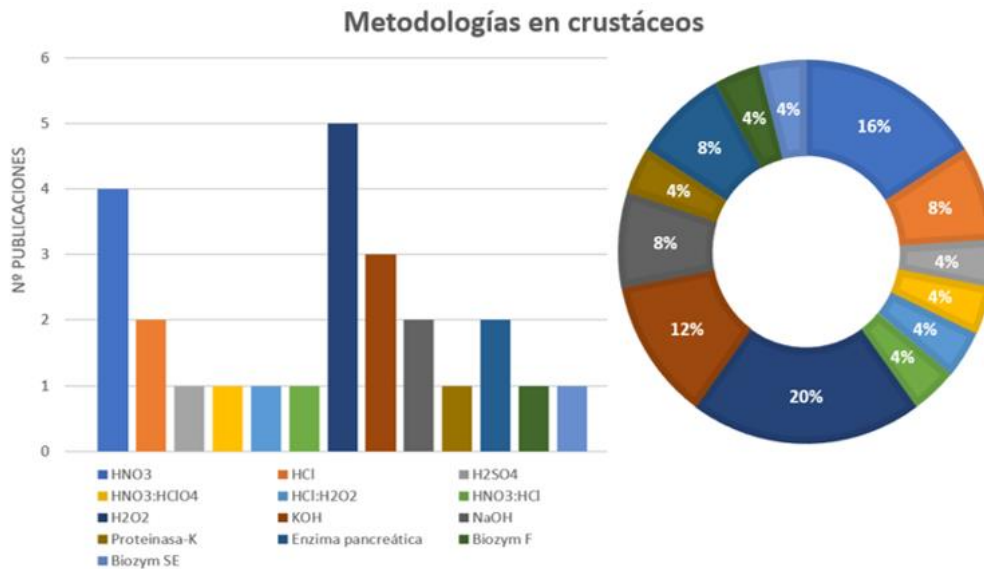


Figura 20: Metodologías de digestión empleadas en crustáceos.

4.1.2.4. Elasmobranquios

Si bien el grupo de elasmobranquios no es el más utilizado en estudios de microplásticos, es de mayor importancia en el presente trabajo. Se han empleado un total de 5 especies entre las 5 publicaciones utilizadas (Avio *et al.*, 2015; Bellas *et al.*, 2016; Pullen, 2019; Valente *et al.*, 2019; Mancía *et al.*, 2020) tal y como puede observarse en la figura 21. De entre estas publicaciones, se observa una gran dominancia de la especie de interés, *Scyliorhinus canicula*, la cual es utilizada en 3 investigaciones de extracción de microplásticos (Bellas *et al.*, 2016; Valente *et al.*, 2019; Mancía *et al.*, 2020).

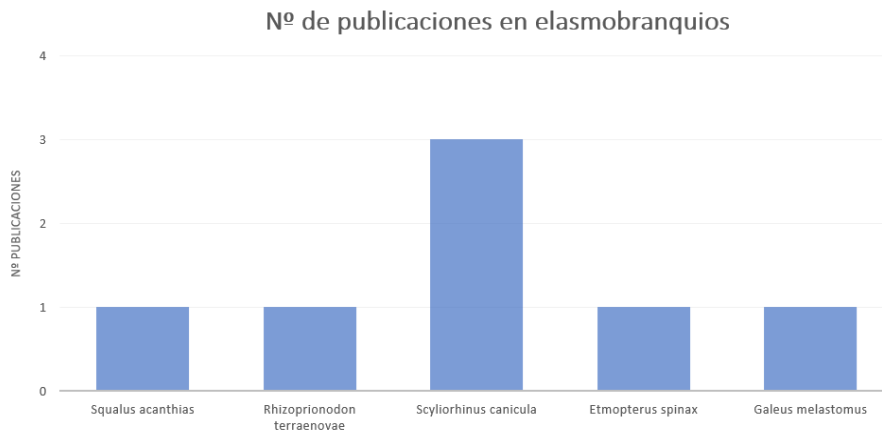


Figura 21: Número de publicaciones en las cuales aparece cada especie de elasmobranquios.

En cuanto a las metodologías de digestión utilizadas en este grupo de organismos, puede apreciarse en la figura 22 que hay dos tipos de metodologías más abundantes. Las basadas en el uso de H₂O₂, que aparecen en 2 publicaciones (Avio *et al.*, 2015; Pullen, 2019), y las basadas en el uso de KOH, presentes también en dos publicaciones (Valente *et al.*, 2019; Mancía *et al.*, 2020).

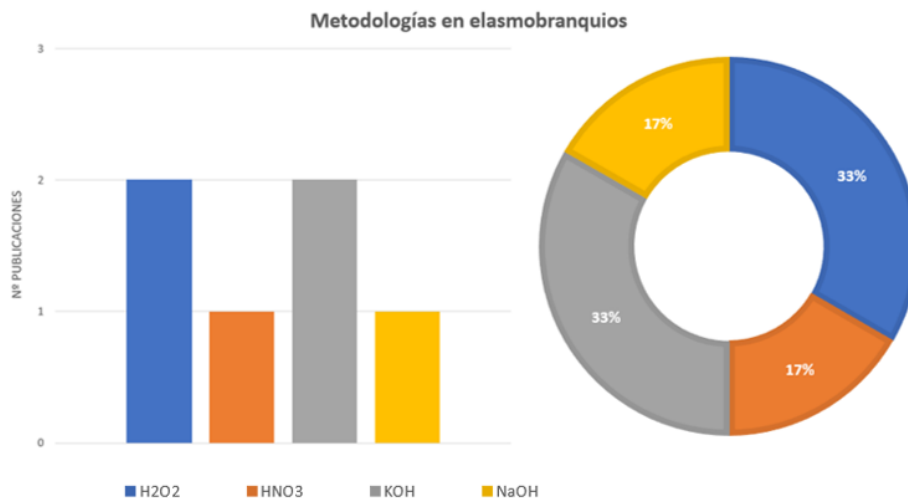


Figura 22: Metodologías de digestión empleadas en elasmobranquios.

4.1.2.1.1. *Scyliorhinus canicula*

De entre las publicaciones seleccionadas, como se ha mencionado anteriormente, destacan tres por el uso del *S. canicula* (Bellas *et al.*, 2016; Valente *et al.*, 2019; Mancía *et al.*, 2020), especie de interés de este trabajo. De estas tres investigaciones, se muestran a continuación (figura 23) aquellas metodologías empleadas en los tractos gastrointestinales de *S. canicula*. En las cuales se tiene preferencia por el uso de metodologías alcalinas, especialmente por el uso de KOH como disolución de digestión (Valente *et al.*, 2019; Mancía *et al.*, 2020).

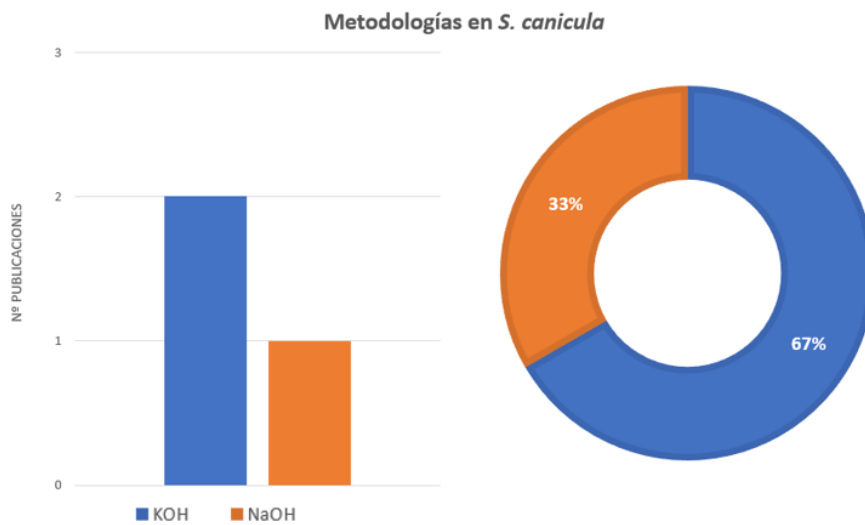


Figura 23: Metodologías de digestión empleadas en *S. canicula*.

4.1.2.5. Reptiles marinos

Los reptiles marinos, concretamente tortugas, aparecen en 3 publicaciones de las totales seleccionadas. En estas investigaciones de extracción de microplásticos han empleado *Chelonia mydas* (Caron *et al.*, 2018a) y *Caretta caretta* (Caron *et al.*, 2016; Caron *et al.*, 2018b). En las tres investigaciones se ha utilizado una metodología de digestión ácida basada en el uso de HNO_3 en los tractos gastrointestinales de los ejemplares para la extracción de microplásticos (Caron *et al.*, 2016; Caron *et al.*, 2018a; Caron *et al.*, 2018b).

4.1.2.6. Mamíferos marinos

Únicamente ha sido encontrada una publicación que utilice tractos gastrointestinales de mamíferos marinos en la extracción de microplásticos, y en la cual, se utilizaron dos especies de pinnípedos, *Arctocephalus tropicalis* y *Arctocephalus gazella* (Nelms *et al.*,

2018). El proceso de digestión de las muestras en este estudio fue realizado mediante metodología enzimática basada en el uso de proteinasa-K (Nelms *et al.*, 2018).

4.1.2.7. Anélidos

Destacan entre 3 de las publicaciones encontradas, en las cuales se emplean ejemplares del género de poliquetos *Marenzelleria sp.* (Gutovskaia, 2019), y dos especies distintas, *Arenicola marina* (Wang and Wang, 2018) y *Perinereis aibuhitensis* (Jiang *et al.*, 2018). En estas investigaciones, los portocolos realizados se basan en la digestión del organismo completo, en el caso de los ejemplares de *Marenzelleria sp.* Mediante el uso de enzimas pancreáticas (Gutovskaia, 2019), y para *Arenicola marina* y *Perinereis aibuhitensis*, mediante digestión ácida con HNO₃ (Jiang *et al.*, 2018, Wang and Wang, 2018).

4.1.2.8. Cnidarios

Tan sólo en 1 de las publicaciones seleccionadas se utilizaban especies de cnidarios, *Mertensia ovum*, *Cyanea capillata* y *Aurelia aurita* (Gutovskaia, 2019). La metodología de digestión utilizada en el estudio fue de tipo enzimática mediante el uso de enzimas pancreáticas (Gutovskaia, 2019).

4.1.2.9. Priapúlidos

Únicamente una publicación menciona el uso de estos organismos para la extracción de microplásticos. La especie utilizada es *Halicryptus spinulosus* mediante un protocolo de digestión enzimática del organismo completo basada en el uso de uso de enzimas pancreáticas (Gutovskaia, 2019).

4.1.2.10. Poríferos

Una de las publicaciones utiliza a estos organismos para la extracción de microplásticos. La especie seleccionada es *Hymenacion perlevis* empleando un protocolo de digestión ácida del organismo completo, con HNO₃ (Karlsson *et al.*, 2017).

5. DISCUSIÓN

A continuación, se analizarán los resultados más relevantes de las metodologías de digestión utilizadas en los distintos grupos zoológicos mencionados anteriormente, a partir de las publicaciones seleccionadas.

5.1. Teleósteos

Tal y como se ha mencionado antes, los protocolos de digestión alcalinos son predominantes en investigaciones en teleósteos. El uso de la disolución de KOH resulta ser una opción realmente válida para la extracción de partículas plásticas en tractos intestinales de estos organismos; pues la disolución no provoca graves daños a la estructura del polímero (Dehaut *et al.*, 2016; Lusher, 2017) y a su vez mantiene la posible degradación ya existente por causas ambientales (decoloración, microrroturas, ...) y también por el paso por el tracto gastrointestinal (Kühn *et al.*, 2016).

De entre las especies más destacadas en estudios de microplásticos, *Mullus barbatus* y *Merluccius merluccius* son ampliamente utilizados en éstos. El estudio de Giani *et al.* (2019) emplea estas dos especies con el protocolo de digestión basado en KOH. Los resultados obtenidos tras la digestión de 12 a 6 h. a 60°C son positivos, sin dañar a las partículas presentes en los tractos gastrointestinales y permitiendo hacer una clasificación según el color, forma y tamaño. Así ambas especies resultan eficaces en la caracterización de la presencia de microplásticos en el medio marino, con una media aproximada de 2 partículas plásticas por muestra digerida (figura 24).

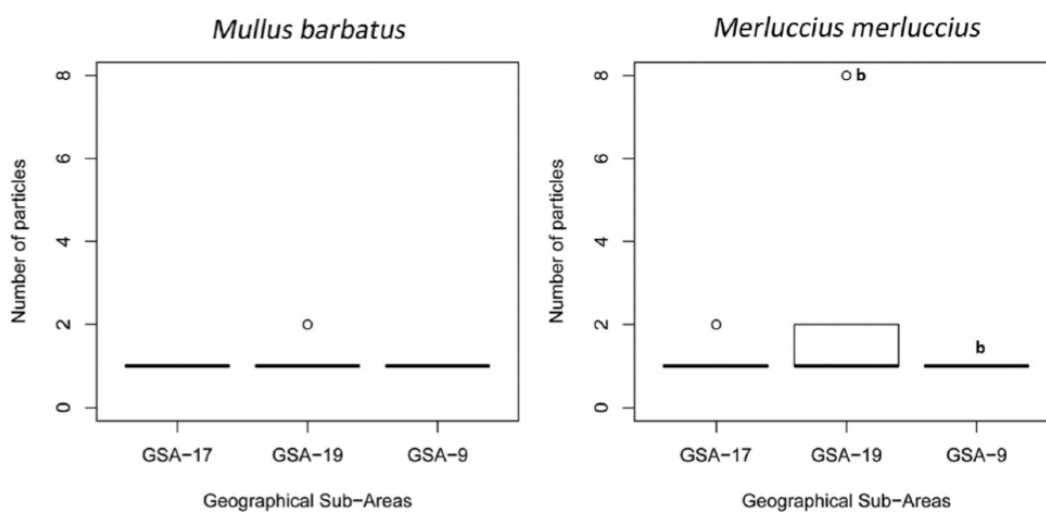


Figura 24: Número de partículas plásticas encontradas por organismo. **GSA-17:** Mar Adriático; **GSA-19:** Mar Jónico; **GSA-9:** Norte del mar del Tirreno. Fuente: Giani *et al.*, 2019.

La investigación realizada por Wieczorek *et al.* (2018) muestra un 73% de ejemplares contaminados por microplásticos, de los cuales se obtuvo una tasa de recuperación del 98% de los polímeros y pudiendo realizar su posterior identificación mediante con análisis Micro-FTIR tras 24 h. de digestión con KOH 1M. La figura 25 muestra los porcentajes de polímeros extraídos de los ejemplares del estudio, abarcando parte de polímeros que tienden al desgaste con otras metodologías como la PA o el PE (Dehaut *et al.*, 2016; Wieczorek *et al.*, 2018).

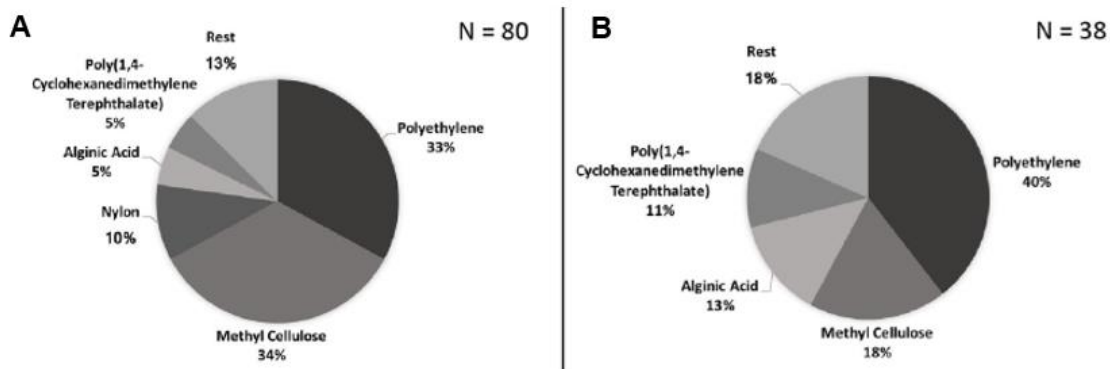


Figura 25: Polímeros identificados post-digestión. Fuente: Wieczorek *et al.*, 2018

De este proceso se han realizado variaciones respecto a la concentración de la disolución de digestión, como el tiempo del proceso y la temperatura a la que es sometido. Así pues, la investigación llevada a cabo por Karbalaei *et al.* (2019) emplea la disolución de KOH al 10% y mantenida a 40°C durante 72 h. Tras realizar la digestión de los tractos intestinales siguiendo dicho protocolo se obtuvieron fragmentos (en un 67,4%), fibras (16,3%) y “*pellets*” (16,3%) capaces de identificarse a *visu*, y en las cuales, el polímero dominante correspondía al PE (88.4%), seguido por PP (9.3%) y PET (2.3%).

Dentro de las metodologías alcalinas, también se ha utilizado, en menor medida, disoluciones de NaOH en la digestión de las muestras de teleósteos. Si bien no es agresiva contra la estructura de los polímeros, no presenta la misma eficacia de digestión que el KOH, siendo necesarios tiempos de digestión más prolongados o su combinación con otros solventes, tal y como expresan Roch y Brinker (2017), por ejemplo, con HNO₃.

Como alternativa, se sitúan las metodologías ácidas en la digestión de muestras biológicas procedentes de teleósteos, ampliamente utilizadas, pero donde predomina el uso de las disoluciones de HNO₃. Las investigaciones realizadas por Sun *et al.* (2019) y

Zhao *et al.* (2019) demuestran la eficacia del uso de esta disolución en el proceso digestivo, mediante el uso de las mismas especies, y tal y como se observa en la figura 26, se obtuvieron microplásticos en una amplia gama de tamaños presentes en los tractos digestivos digeridos, con una longitud media de $262 \pm 101 \mu\text{m}$ en los ejemplares, excepto en *Eupleurogramms muticus* siendo de $1430 \pm 430 \mu\text{m}$, y *Apogon lineatus*, de $1214 \pm 537 \mu\text{m}$ (Sun *et al.*, 2019).

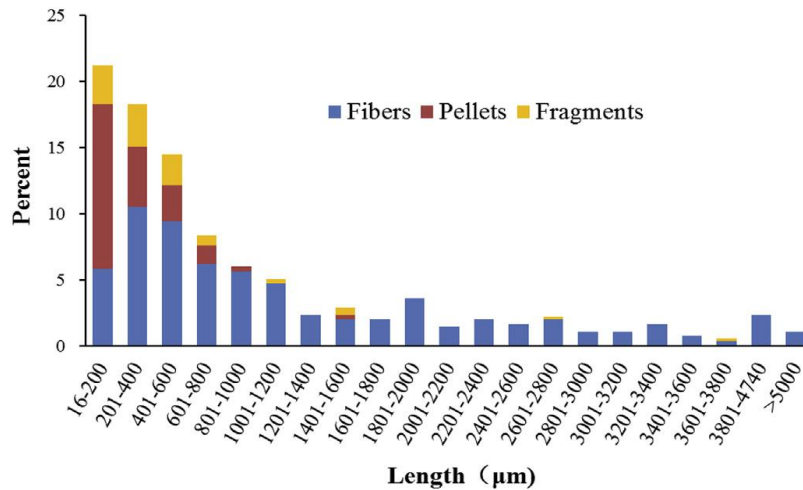


Figura 26: Composición por tamaño de microplásticos en el tracto digestivo de peces. Fuente: Sun *et al.*, 2019.

Junto a ello, la composición química de los microplásticos detectados en los tractos digestivos de las especies es posible de identificar mediante mFT-IR, aun detectando polímeros que han sufrido oxidación durante la oxidación (40%), podía identificarse partículas de PE (22%), PA (11%), PP (3%), PS (2%), entre otros (Sun *et al.*, 2019).

Dicha metodología ha sido optimizada en varios estudios, Chan *et al.* (2019) muestra una variante del proceso de digestión mediante el uso de HNO_3 tras someter los estómagos a 5 mL de solvente a ultrasonificación, 60°C durante 10 min para facilitar la desagregación del material biogénico, y posteriormente someter el extracto a 24 h. a HNO_3 concentrado (68%). Si bien esta variante acelera el tiempo de digestión, se ve limitada por la temperatura pues al no superar los 60°C no fue suficiente para digerir los tejidos biológicos. De esta forma se encontró la cantidad de microplásticos ingeridos en *Evynnis cardinalis* con el 66,7 % de los individuos contaminados, seguido de *Solea ovata* (59,1 %), *Lutjanus stellatus* (57,7 %), *Repomucenus richardsonii* (53,8 %) e *Inegocia japonica* (47,3 %) (figura 27). Todos estos valores pueden estar influenciados por los hábitos alimenticios entre especies o tamaños de los ejemplares, explicando así la variación en la ocurrencia/abundancia de los microplásticos ingeridos.

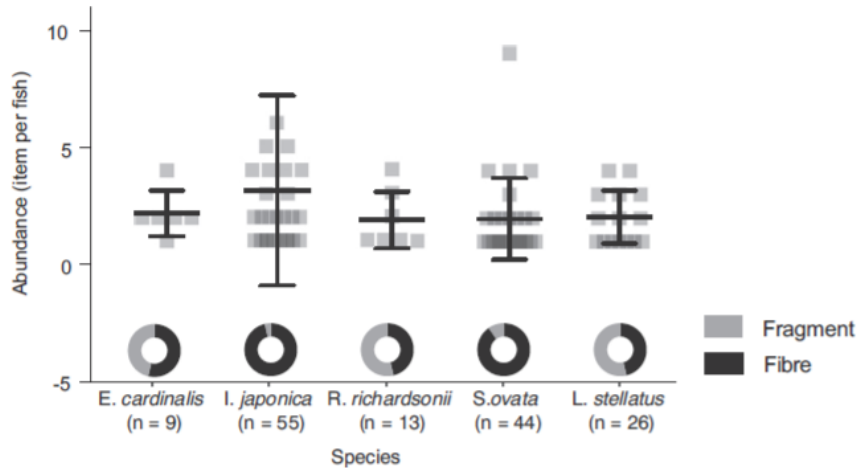


Figura 27: Abundancia y tipo de microplásticos encontrados en peces clasificados por peces. Fuente: Chan et al., 2019.

También debe mencionarse el uso de la disolución $\text{HNO}_3:\text{HClO}_4$, utilizada en otros estudios; si bien no es la metodología más recomendada por la degradación que causa a los polímeros (Dehaut et al., 2016). El estudio realizado por Azizah y Saragih (2019) revela microplásticos en los estómagos de los ejemplares analizados, clasificados en tres tipos, fragmentos (9%), fibras (73%) y “pellets” (18%) (figura 28). Los cuales aumentaban su frecuencia de aparición cuanto mayor era el tamaño del pez.

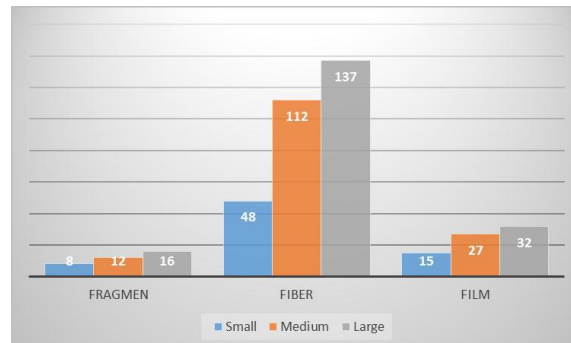


Figura 28: Acumulación de tipos microplásticos encontrados en función del tamaño de los peces. Fuente: Azizah and Saragih, 2019.

Otras metodologías que han demostrado ser exitosas en teleósteos son las oxidativas mediante el uso de H_2O_2 , y generalmente, siguiendo el mismo procedimiento. Éste consiste en exponer los tejidos blandos y susceptibles de presentar microplásticos (branquias, glándulas digestivas, estómago y contenido intestinal) a una solución de H_2O_2 al 30% y se calentada a 55 – 65 °C hasta su evaporación. Dicha metodología no resulta tan agresiva ante los polímeros como las ácidas, Digka et al. (2018) muestra el porcentaje de fragmentos y fibras en ejemplares de *Sardina pilchardus* de un 80% y 20% respectivamente para sardinas, de un 73,3% y 26,7% para *Chelidonichthys*

lucernus y 83,3% y 17,7% para *Mullus barbatus* (figura 29), así como la variedad de plásticos encontrados en muestras de dichas especies.

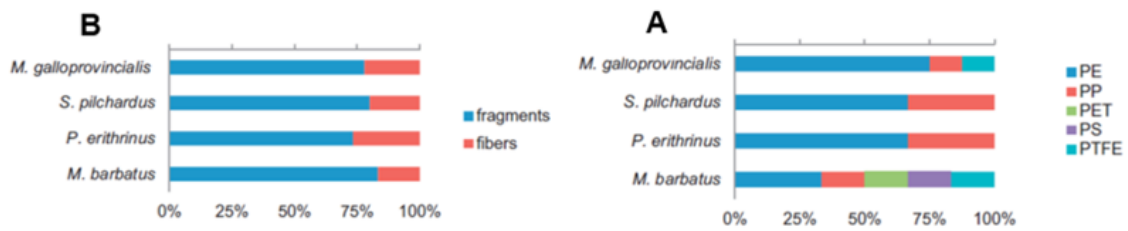


Figura 29: Resultados del estudio. **A:** tipos de polímeros encontrados en las muestras. **B:** tipología de los microplásticos según su forma en las muestras. Fuente: Digka et al., 2018.

Las metodologías enzimáticas no son de gran relevancia en estudios con teleósteos, si bien son eficaces en la digestión de los tractos intestinales de los ejemplares y no causan graves daños a los polímeros. Naidoo *et al.* (2019) en su investigación, mediante el uso de Proteinasa-K junto con una solución tampón de Tris EDTA Buffer a pH 8, obtuvo partículas ingeridas clasificadas según la tipología del polímero, observando la figura 30, se aprecia la presencia de rayón (70,4%), PE (10,4%), PA (5,2%) y PVC (3%); siendo algunos de estos polímeros degradados mediante el uso de metodologías ácidas u oxidativas.

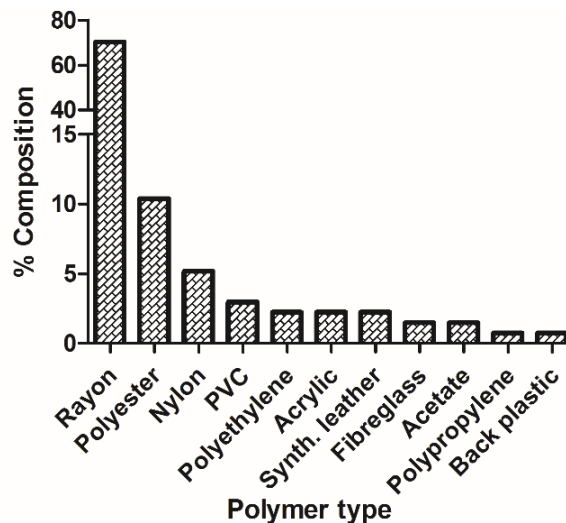


Figura 30: La distribución de microplásticos ingeridos según la tipología del polímero. Fuente: Naidoo et al., 2019.

5.2. Moluscos

Los moluscos, posicionados como el segundo grupo zoológico de mayor relevancia en la extracción de microplásticos presentan excelentes resultados en los procesos de digestión del organismo completo. En este grupo, la metodología que más destaca en cuanto su uso es la de tipo ácida empleado HNO₃. Dicha metodología se coloca junto al

uso de KOH, como de mayor reconocimiento respecto a su eficacia en la digestión del material biogénico (Phuong *et al.*, 2017; Arossa *et al.*, 2019; Naidu, 2019).

La investigación llevada a cabo por Phuong *et al.* (2017) somete a ejemplares de *Mytilus edulis*, uno de los organismos que mejores resultados ha otorgado en procesos de extracción de microplásticos, a ser digerido en disoluciones de HNO₃ y KOH. La eficacia digestiva para ambos reactivos (KOH al 10% y HNO₃ al 65%) a distintos volúmenes fue testeada en los tejidos blandos, resultando en menos de 1% de materia orgánica restante en los filtros (figura 31).

Reagents	Experimental conditions					Remaining mussel soft tissues after digestion step % mean ± standard deviation (n = 3)
	Volume (ml)	Contact (h)	Heating (h)	Agitation	Porosity (µm)	
HNO ₃	20	24	2	No	5	0.455 ± 0.010
	50	24	2	No	5	0.425 ± 0.025
	50	0	24	Yes	5	0.768 ± 0.126
KOH	20	24	2	No	5	0.225 ± 0.009
	50	24	2	No	5	0.092 ± 0.026
	50	0	24	Yes	5	0.064 ± 0.015

Figura 31: Eficiencias de digestión por KOH y HNO₃ a distintas condiciones. Fuente: Phuong *et al.*, 2017.

La figura 32 en cambio muestra los resultados de recuperación de polímeros obtenidos tras la digestión con KOH fueron comparables con los obtenidos en el blanco; donde no se observó ningún daño significativo en la mayoría de los polímeros probados (PE, PP, PVC). Por el contrario, no se observaron partículas de estos tipos tras la digestión con HNO₃ (Phuong *et al.*, 2017).

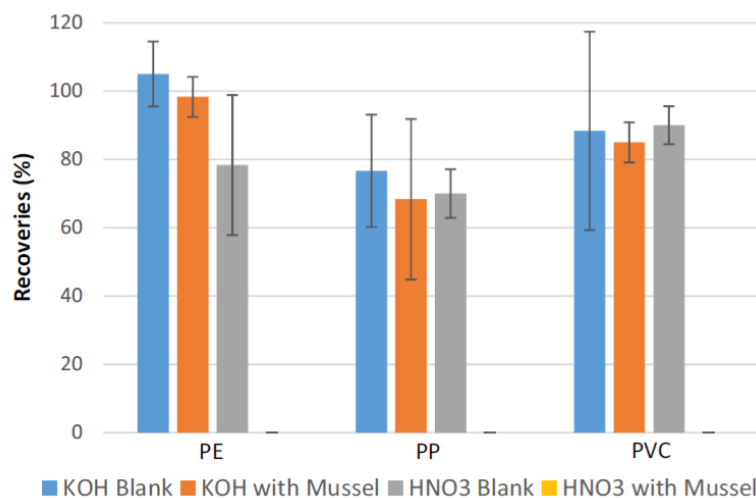


Figura 32: Recuperaciones (en %) de los microplásticos (PE, PP, PVC). Fuente: Phuong *et al.*, 2017.

Estos resultados reafirmarían que las disoluciones HNO₃ otorgan malos resultados respecto al mantenimiento de integridad de los polímeros del estudio destacando la degradación completa de algunos como PA o CA, acompañada de una disminución en el peso de las partículas; y muestras de amarillamiento en el resto de los polímeros (Dehaut *et al.*, 2016; Lusher, 2017, Phuong *et al.*, 2017; Munno *et al.*, 2018).

El protocolo de digestión mediante KOH no ha sido efectivo sólo en *Mytilus edulis*, el “*R & D – project*” empleó distintos ejemplares de *Mytilus ssp.* como biomonitores de microplásticos mediante un proceso digestivo de KOH al 10% durante 24 h. a 60 ° C con agitación continua a 145 rpm (Lusher *et al.*, 2017). Mediante este protocolo se identificaron un total de 616 partículas mediante identificación visual, de las cuales el 66% eran minimicroplásticos, el 32% se clasificaron como microplásticos y el 2% restante como mesoplásticos (figura 33). Junto a ello, identificaron una amplia gama de polímeros incluyendo PE, PET, PMMA, PP, PA, EVA, resina epoxi (con bisfenol A) y polímeros a base de celulosa, como CA, rayón y celofán (Lusher *et al.*, 2017).

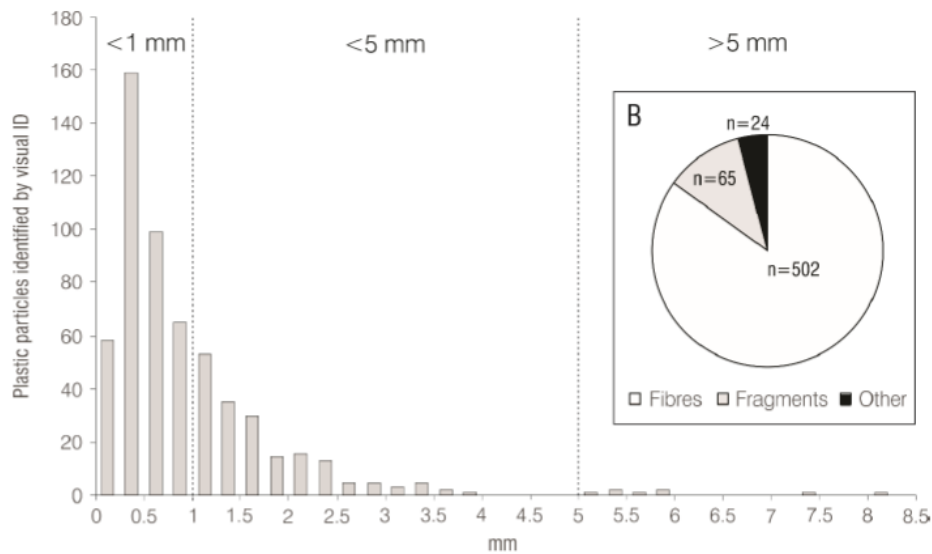


Figura 33: Distribución de tamaño (A) y forma (B) de microplásticos extraídas de ejemplares de *Mytilus ssp.* Fuente: Lusher *et al.*, 2017.

Conociendo la degradación que causan las digestiones ácidas en los polímeros (Dehaut *et al.*, 2016; Lusher, 2017) el uso de metodologías oxidativas mediante H₂O₂ se posiciona como otra metodología prometedora en moluscos. El estudio realizado por Li *et al.* (2015) en especies de moluscos comerciales emplea H₂O₂ al 30%, a 65 °C, 80 rpm, durante 24 h. en la digestión de tejidos blandos. Tal y como observarse en la figura 33a, mediante este protocolo se obtuvieron un número total de partículas de entre 2,1 a

10,5 por gramo digerido y de 4,3 a 57,2 por individuo (figura 34b). Junto a ello, los polímeros pudieron ser clasificados por tamaño, el cual variaba de 5 µm a 5 mm en las muestras examinadas. Los microplásticos menores de 250 µm de tamaño fueron los más comunes representando el 33 - 84% del total por especie (figura 34c).

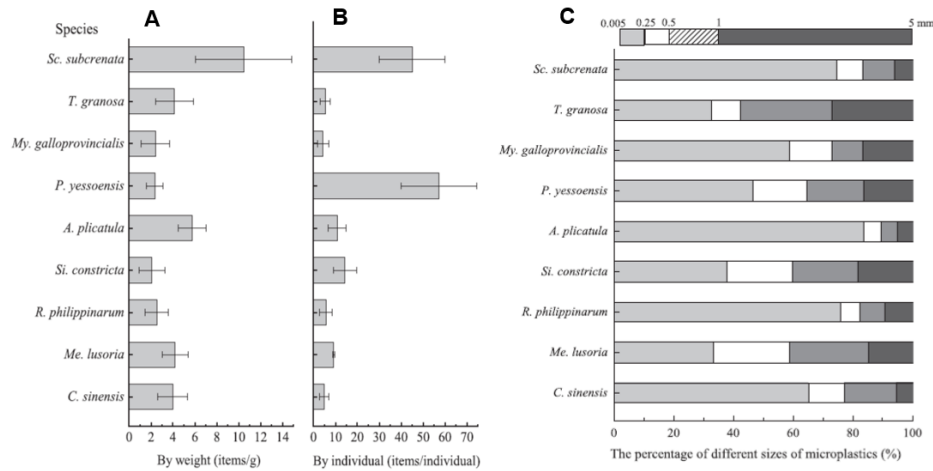


Figura 34: Resultados del estudio realizado en especies comerciales. **a:** Abundancia de microplásticos por peso. **b:** Abundancia de microplásticos por individuo. **c:** Presencia (en %) de los diferentes tipos de tamaño de microplásticos por especie. Fuente: Li et al., (2015).

Otras de las metodologías a destacar hacen de enzimas en la digestión, en las cuales *Mytilus edulis* vuelve a ser una especie ampliamente usada en estos protocolos. Courtene-Jones et al. (2017) realizó una investigación sometiendo muestras de *Mytilus edulis* a distintos extractos enzimáticos a distintas concentraciones (2,5%, 1,25%, 0,625%, 0,3125%, 0,15% y 0,08%) con objetivo de comprobar la eficacia digestiva. La tripsina fue la que otorgó mejores resultados a una concentración de 0,3125%. Tras una exposición de 30 min otorgó resultados de una eficiencia del 88% ± 2.52% de tejido digerido (figura 35).

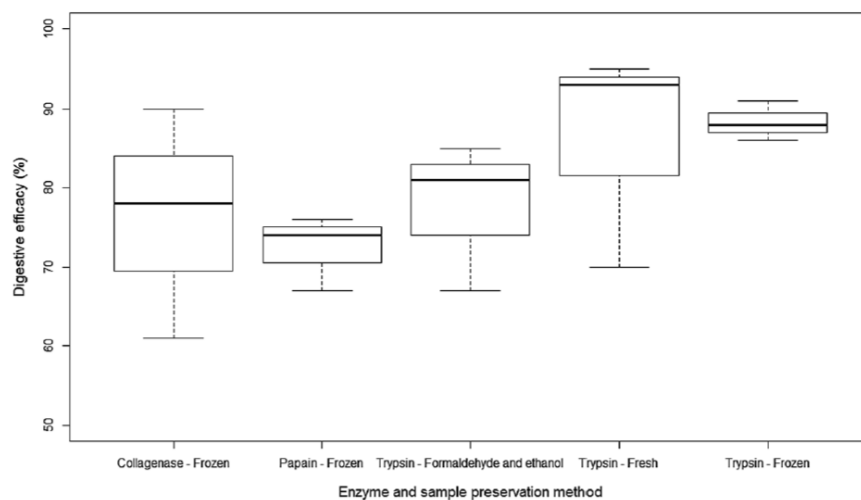


Figura 35: Eficacia digestiva de tripsina, colagenasa y papaína a una concentración del 0.3125% en muestras de mejillón. Fuente: Courtene-Jones et al., 2017.

Junto a ello, se realizó una recapitulación de microplásticos más comunes, en distintas categorías (categoría 1: PET, categoría 2: HDPE, categoría 3: PVC, categoría 4: PP y categoría 5: PS y PA) con el objetivo de valorar la tasa de recuperación de los polímeros en el proceso digestivo (figura 36). Tras realizarlo, no hubo cambios en la morfología, color o de tamaño en las partículas para cualquiera de los polímeros investigados (Courtene-Jones *et al.*, 2017).

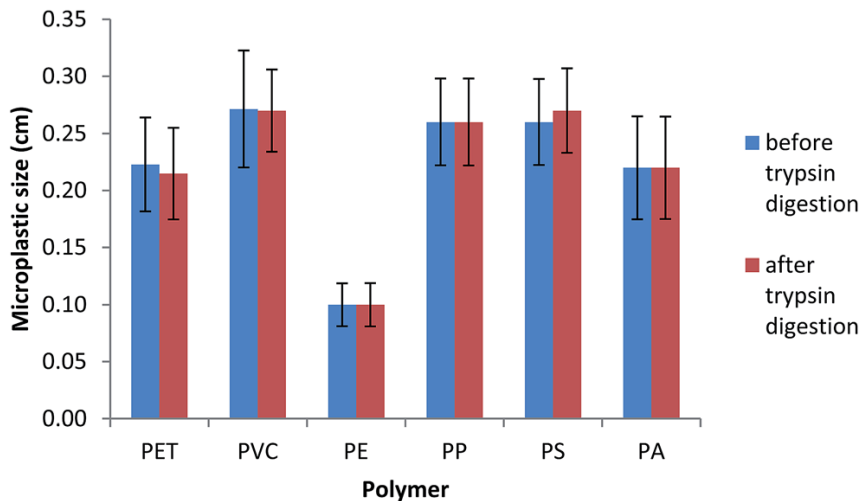


Figura 36: Tamaño medio de los polímeros antes y después de la digestión con 0,3125% de tripsina. Fuente: Courtene-Jones *et al.*, 2017.

5.3. Crustáceos

Dentro del grupo de los crustáceos, los protocolos digestivos más abundantes son aquellos basados en los tratamientos con H_2O_2 , los cuales han demostrado en diversos estudios (Avio *et al.*, 2015; Roch and Brinker, 2017; Digka *et al.*, 2018; Liu, 2020) que son tratamientos eficaces en la digestión de tejidos blandos y causan daños mínimos a los polímeros, en contraste de las metodologías ácidas. La investigación llevada a cabo por Hossain *et al.* (2019) emplea una solución de H_2O_2 calentada a 65 °C, sometida a 80 rpm durante 24 h. y posteriormente a temperatura ambiente entre 24 - 48 h. según el efecto de digestión del tejido blando de *Metapenaeus monocerous* y *Penaeus monodon*. Los microplásticos identificados tras la digestión pudieron clasificarse en cuatro categorías de tamaños; en *Penaeus monodon* el 70% de microplásticos eran de mayor tamaño (1 - 5 mm), mientras que el 27% y el 3% pertenecían al rango de tamaño de 1 mm a 500 μm , y 500 - 250 μm respectivamente (figura 37). Por el contrario, en *Metapenaeus monocerous* aquellos menores a 250 μm de tamaños representaban un 7%, entre 250 - 500 μm un 36%, de 500 μm a 1 mm un 40% y de 1 - 5mm que representó un 17% (figura 37). Los microplásticos identificados en las muestras de ambas especies,

podieron ser clasificados también en base a su morfología siendo las fibras la morfología dominante (57%), partículas (29%) y fragmentos (14%).

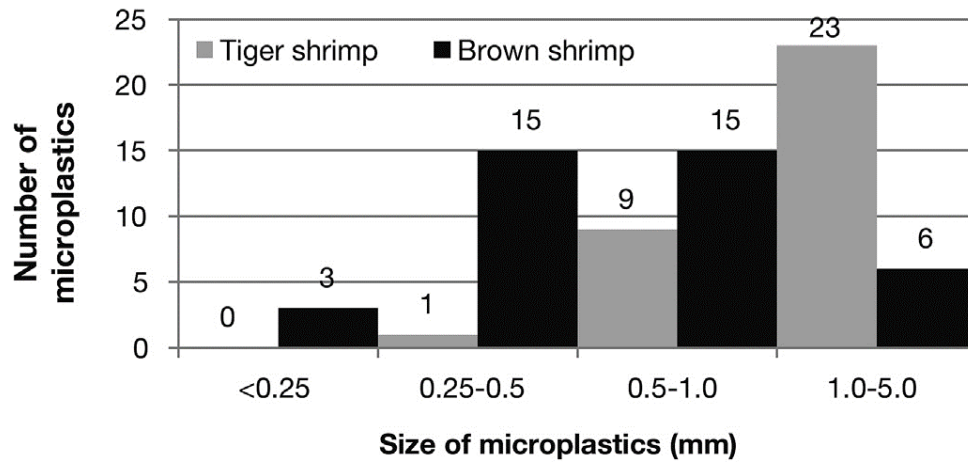


Figura 37: Distribución del tamaño de los microplásticos en los tractos gastrointestinales. Fuente: Hossain et al., 2019.

Otras especies como *Nephrops norvegicus* y *Aristeus antennatus* han sido sometidas a tratamientos de H₂O₂ a la hora de digerir los tractos intestinales en la caracterización de microplásticos; otorgando grandes resultados donde los polímeros podían ser caracterizados. LA figura 38 muestra los resultados obtenidos de la digestión, en el caso de *Nephrops norvegicus* han llegado a reportarse la presencia de PE, PP, PA, PES, PU, PS, ABS y poliisopreno. En cambio, en *Aristeus antennatus* se han encontrado PE, PES, PP, PS, PA, PU y EVA (Cau et al., 2019).

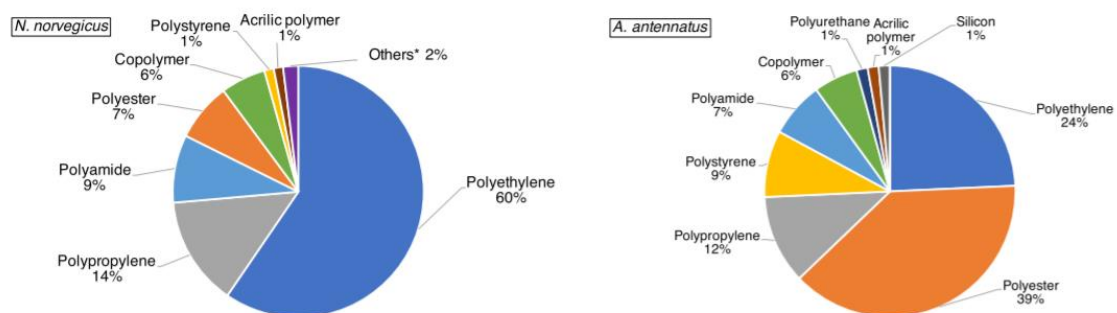


Figura 38: Composición de polímeros recuperados de los estómagos de *N. norvegicus* y *A. antennatus*. Fuente: Cau et al., 2019.

En los que respecta a las metodologías ácidas, destaca el hecho de que gran parte de los estudios encontrados se han realizado sobre crustáceos pertenecientes al zooplancton. Debido al papel ecológico vital como consumidores primarios en las redes tróficas, así como su importancia como etapas juveniles de especies comerciales la presencia de desechos plásticos en estos organismos es el primer paso de la biomagnificación (Cole et al., 2013). Dado su tamaño, las digestiones basadas en

solventes ácidos resultan abundantes con objetivo de digerir el organismo completo y caracterizar los microplásticos presentes. El estudio realizado por Desforges *et al.* (2015) empleó una disolución de HNO₃ y otra de HCl:HNO₃ con resultados óptimos en la digestión de los tejidos calentarse y pudiendo encontrar fibras microplásticas tras la digestión en ambos casos. El tamaño promedio de los microplásticos ingeridos fueron mayores en *Euphausia pacifica* (816 ± 108 µm) siendo 68% de estas fibras; frente a *Neocalanus cristatus* (556 ± 149 µm), de las cuales eran fibras el 50% (Desforges *et al.*, 2015). También se han realizado estudios con metodologías ácidas empleando disoluciones de HCl, H₂SO₄ y HNO₃ en estómagos de *Callinectes sapidus*, los cuales se sometieron durante 48 horas a 20 °C, y pudieron extraerse fragmentos y fibras de PP, PS, HDPE, PA y PVC deteriorados (Elijah-Nathaniel, 2014).

En proporciones similares, se han empleado metodologías alcalinas y enzimáticas en crustáceos. El estudio llevado a cabo por Piarulli *et al.* (2019) emplea ejemplares de *Carcinus aestuarii* para la extracción de microplásticos digiriendo los organismos completos en dos tipos de disoluciones; una empleando KOH al 10% y otra con dos tipos de enzimas Biozym SE y Biozym F, ambas a 5 mL. Ambas digestiones ofrecieron resultados prometedores donde los microplásticos identificados eran microfibras, en el caso de KOH se identificaron únicamente aquellas de PES; frente a la digestión enzimática, donde eran de PES en un 50%, PA en un 25% y ABS en el 25% restante (figura 39)

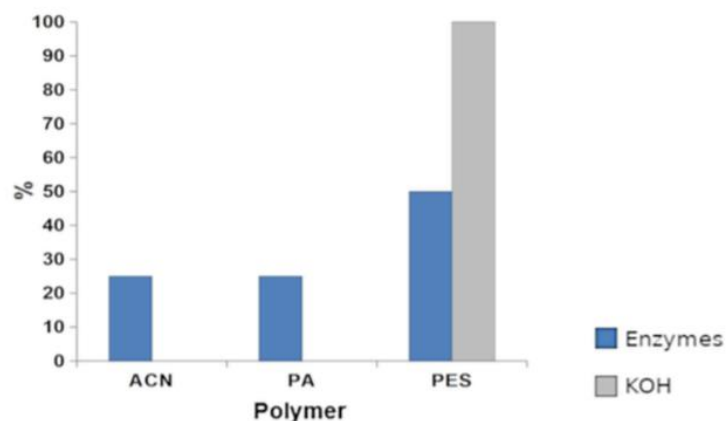


Figura 39: Partículas sintéticas extraídas de *C. aestuarii* con los métodos de digestión enzimática y alcalina (KOH). Fuente: Piarulli *et al.*, 2019.

Dentro de las metodologías también se han empleado para comparar los resultados de eficiencia respecto a la digestión de los tejidos biogénicos y afección a los microplásticos presentes, así pues, Hará *et al.* (2020) empleó los tractos digestivos de la especie

mencionada anteriormente *Nephrops norvegicus*. Se utilizaron disoluciones de KOH (10%) a 40 °C durante 48 h. junto a HNO₃ durante 48 h. y una disolución mezcla de KOH y Tween20, a 50 °C.

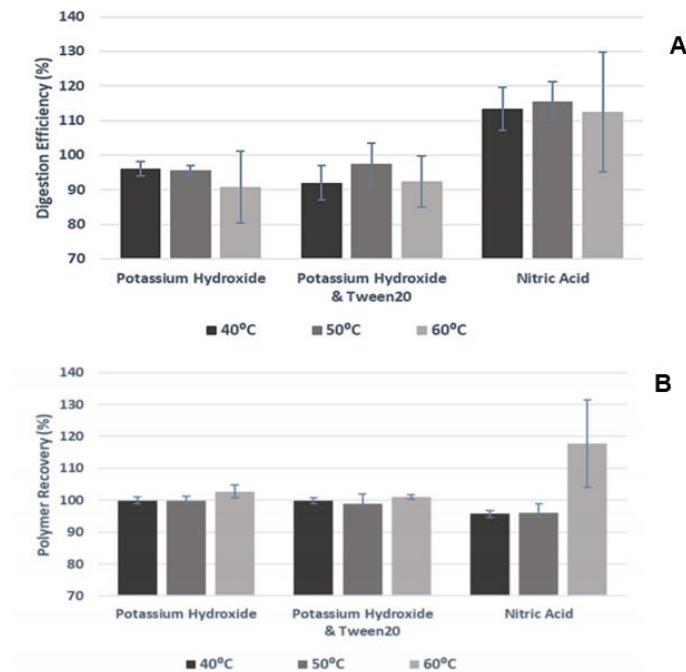


Figura 40: Resultados de la digestión de *Nephrops norvegicus*. a: Eficiencia digestiva. b: Tasa de recuperación de polímeros. Fuente: Hará et al., 2020.

Los resultados obtenidos por Hará *et al.* (2020) muestran que el uso de la disolución de KOH (10%) resultó ser la más efectiva con un porcentaje promedio de $96,03 \pm 2,15$; seguida de la disolución de KOH:T20, con una alta tasa de eficiencia, dentro del rango óptimo establecido entre 95% –105% y en último lugar la disolución de HNO₃ resultó en una tasa de digestión promedio mayor del 110% donde también se produjo la degradación de algunos polímeros (figura 40a). En cuanto a la tasa de recuperación de polímeros, se buscaba la presencia de LDPE HDPE, PET, PS, PP y PA; y las disoluciones KOH y KOH:T20 otorgaron altas tasas de recuperación desde $99,88 \pm 0,15\%$ - $102,74 \pm 2,07\%$ y $99,80 \pm 0,12\%$ - $101,00 \pm 0,66\%$, respectivamente. Por el contrario, la disolución de HNO₃ causó la degradación de algunos, resultando en tasas de recuperación menores al 96% y a 60 ° C, la mayoría de los polímeros quedaban derretidos y deformados parcialmente, excepto PA que se degradó a todas las temperaturas testeadas con HNO₃ (figura 40b).

5.4. Elasmobranquios

En el análisis de tractos gastrointestinales de elasmobranquios mediante digestión ácida, usando HNO₃ 22.5 M (Avio *et al.*, 2015), se ha demostrado como un tratamiento

útil para eliminar material biológico facilitando el aislamiento de partículas de plástico, sin embargo, causa una degradación parcial de aquellos polímeros con poca tolerancia a pH bajos como PA, PS o PE. En este estudio también se aplicó un protocolo de digestión basado en el uso de H₂O₂ al 30% (Avio *et al.*, 2015; Roch and Brinker, 2017), el cual permitió extraer casi el 70% de partículas presentes en la muestra; una recuperación relativamente baja atribuida en parte a la formación de espuma que obstaculiza la filtración y el procesamiento posterior de muestras. Aún con esos inconvenientes, la recuperación de partículas plásticas fue mayor que con el protocolo basado en HNO₃.

Junto a ello, el estudio realizado por Pullen (2019) mediante un protocolo de digestión empleando H₂O₂ al 15% mostró microplásticos en las muestras de *Rhizoprionodon terraenovae* en las formas más habituales, siendo fibras en un 93,6%, fragmentos un 5,7%, gránulos un 0,5% y *pellets* un 0,1% (figura 41).

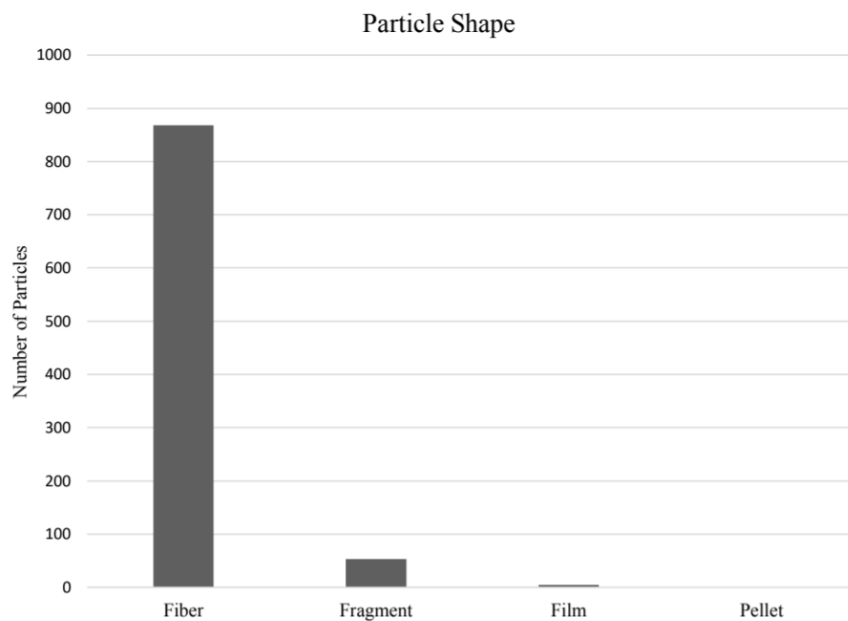


Figura 41: Microplásticos clasificados por morfología encontrados en tractos gastrointestinales de *R. terraenovae*. Fuente: Pullen, 2019.

Respecto a la aplicación de metodologías alcalinas, los protocolos basados en el uso de NaOH muestran resultados óptimos y pueden disolver completamente los tractos gastrointestinales aun conteniendo residuos inorgánicos como arena (Roch and Brinker, 2017). Dicho procedimiento se recomienda usar acompañado de separación por densidad mediante una solución hipersalina (cómo NaCl o NaI). En este caso, la tasa de recuperación media fue aproximadamente del 95%, dependiendo del tamaño de

partícula, y conservando polímeros importantes, como el PVC y PET (Roch and Brinker, 2017).

Pero la metodología que mejores resultados muestra es aquella basada en KOH. Valente *et al.*, (2019) realizó un experimento para comprobar el estado de contaminación por microplásticos mediante el análisis de tractos gastrointestinales de tres especies de elasmobranquios (*Galeus melastomus*, *Scyliorhinus canicula* y *Etmopterus spinax*), mediante el protocolo de digestión de KOH al 10%. Los datos de presencia en las muestras analizadas (figura 42) mostraban frecuencias de aparición del 78.1% en *G. melastomus*, 66.7% en *S. canicula* y 61.8% en *E. spinax*; sin diferencias significativas entre especies. Sin embargo, considerando únicamente el contenido intestinal, se detectaron partículas de plástico con mayor frecuencia en *G. melastomus* (59.4%) y en *S. canicula* (40.0%), en lugar de en *E. spinax* (29.4%)

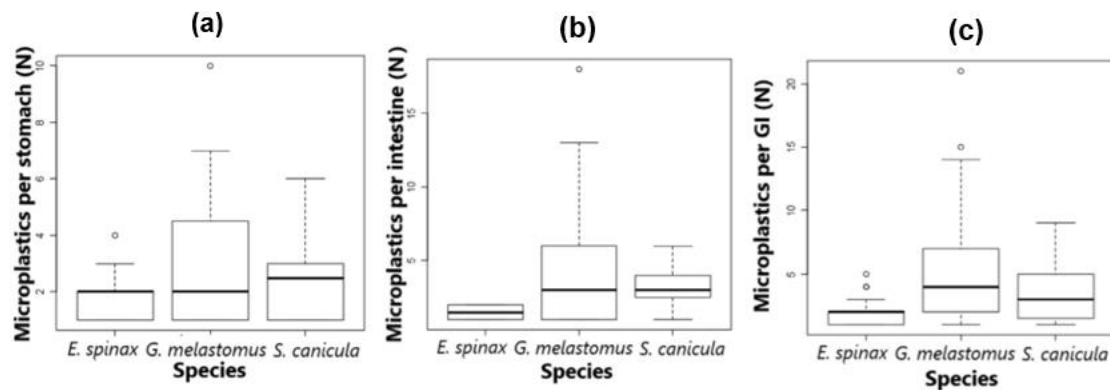


Figura 42: Abundancia de artículos de plástico ingeridos por tres especies de elasmobranquios en la costa de Anzio (Mar Tirreno, Mediterráneo occidental). **a:** Número de microplásticos ingeridas recogidas del estómago. **b:** Número de microplásticos ingeridas recogidas intestino. **c:** Número de microplásticos ingeridas recogidas GI (tracto gastrointestinal, estómago + intestino). Fuente: Valente *et al.*, 2019.

4.2.1.1. *Scyliorhinus canicula*

De las metodologías de digestión que se han aplicado sobre *S. canicula*, cabe destacar que únicamente se han encontrado de tipología alcalina, en dos ocasiones basadas en el uso de KOH y en una, basada en el uso de NaOH. Al igual que Valente *et al.* (2019), como se ha mencionado anteriormente, en la investigación realizada por Mancía *et al.* (2020) se aplica el mismo procedimiento en tractos gastrointestinales de *S. canicula*, obteniendo los resultados post-digestión que se muestran a continuación (figura 43).

Catch area	N. specimens	Total number MP	Filaments	Fragments	Average / fish	Frecuency of ingestion
GSA 16 MDV	25	33	24	9	1.32	71%
GSA 13 LMP	25	26	19	7	1.04	62%

Figura 43: Tabla resumen de los resultados post-digestión de tractos gastrointestinales de *S. canicula*. Fuente: Mancía et al., 2020.

Por otro lado, el estudio realizado por Bellas et al. (2016) en aguas del mediterráneo occidental, emplea una metodología de digestión alcalina basada en el uso de NaOH 1M. Tras realizar el proceso de digestión, la figura 44a refleja que el número total de peces con microplásticos contenidos en sus estómagos eran 37 de los 212 totales obtenidos; y de los cuales 11 muestras de *S. canicula* contenían microplásticos. Junto a ello se contabilizó el número promedio de partículas de aquellas muestras que contenían microplásticos (figura 44b).

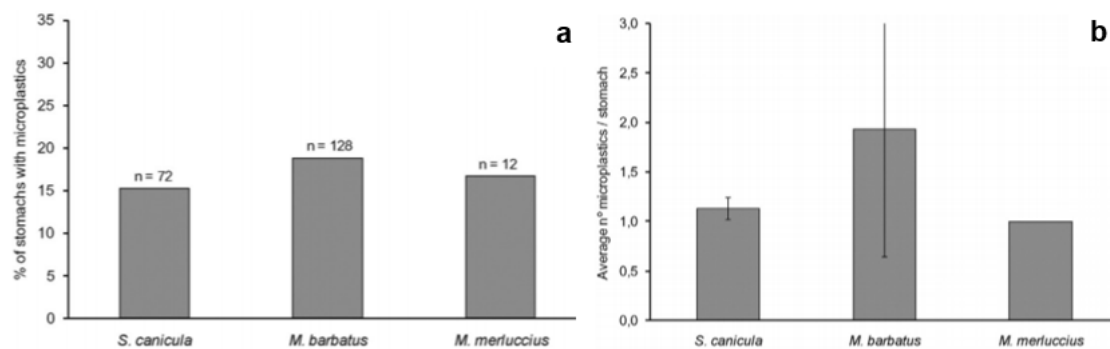


Figura 44: Resultados del proceso digestivo con NaOH 1M. a: Resultados de estómagos con presencias de microplásticos. b: Resultados de promedio de partículas en los estómagos contaminados. Fuente: Bellas et al., 2016.

5.5. Reptiles marinos

Dentro del grupo catalogado como reptiles marinos, las tortugas marinas son los más susceptibles a ingerir desechos marinos debido a sus respectivas dietas herbívoras y basadas en cnidarios (Caron et al., 2018a; Caron et al., 2018b). De éstas, se han empleado ejemplares principalmente de *Chelonia mydas* (Caron et al., 2016; Caron et al., 2018a; Caron et al., 2018b) y de *Caretta caretta* (Renzo et al., 2019) en la extracción de microplásticos de sus tractos digestivos.

C. mydas es una especie muy utilizada en caracterización de microplásticos, en la cual se han realizado varias metodologías distintas. La digestión de sus estómagos con HNO₃ al 69.5% permitió la extracción de plásticos PE, HDPE, PVC y PP sin graves afecciones con una recuperación del 100% de estas piezas y las partículas

microplásticas oscilaban entre los 0,45 mm – 2,51 mm de tamaño (Caron *et al.*, 2018a). En otras situaciones, la digestión con HNO₃ ha provocado la degradación completa de piezas de PET y PA, pero sin afectar a las de PE, HDPE, PVC, y PP; logrando una recuperación del 100% sin cambios en el tamaño de las piezas (Caron *et al.*, 2018b). Junto a ello, las metodologías alcalinas han sido testeadas en estómagos de *C. mydas* empleando disoluciones de NaOH, con objetivo de lograr el mismo grado de digestión que mediante protocolos ácidos, en el cual la mayoría del tejido se disolvió a los 30 min de exposición a la disolución de NaOH, dejando restos que no pudieron ser digeridos (Caron *et al.*, 2016).

Otra especie en la cual se han empleado sus tractos gastrointestinales en procesos de extracción de microplásticos es *Caretta Caretta*, donde Di Renzo *et al.* (2019) utilizó disoluciones de H₂O₂ al 30% para digerir las muestras, obteniendo partículas extraídas constituidas principalmente por fibras (74%), seguida de “pellets” (19%) y fragmentos (7%).

5.6. Mamíferos marinos

Respecto a metodologías de extracción de microplásticos aplicadas en mamíferos marinos, si bien es sabido que se tiene constancia de su presencia en cetáceos de gran tamaño (Fossi *et al.*, 2014), en los artículos empleados solo se tenían registros de metodologías aplicadas a pinnípedos. Nelms *et al.* (2018) empleó los tractos digestivos de ejemplares de *Arctocephalus tropicalis* y *Arctocephalus gazella* en un protocolo de digestión enzimático empleando proteinasa-K durante 24 h a 50 °C con objetivo de caracterizar la presencia de microplásticos en estos organismos y su biomagnificación e través de una presa conocida, *Salmo trutta*.

Tras realizar la digestión de las muestras el 48% contenían microplásticos en su interior, de los cuales el 69% eran fragmentos con tamaños que variaban de 0,4 x 0,3 mm a 5,5 x 0,4 mm y el 31% fibras con una longitud media de 1,5 mm. También se realizó una caracterización de los polímeros encontrados mediante análisis FTIR, donde los más abundantes fueron EPR y PP (ambos un 27%) seguido de PE (12%), poliacrilamida y caucho de estireno butadieno (ambos un 8%), neopreno, EPDM, NBR, PA, Kevlar, PU (todo un 4%) (Nelms *et al.*, 2018).

5.7. Anélidos

El grupo zoológico de anélidos no ha destacado entre los empleados en los artículos encontrados; si bien se han empleado ejemplares de poliquetos del género *Marenzelleria ssp.* (Gutovskaia, 2019), de *Perinereis aibuhitensis* (Jiang *et al.*, 2018) y *Arenicola marina* (Wnag and Wang, 2018).

Los ejemplares de *Marenzelleria ssp.* fueron expuestos a 48 h. de exposición a una disolución digestiva de enzimas pancreáticas dado su tejido suave y pulposo, haciendo fácil la digestión del organismo (Gutovskaia, 2019), pero se han aplicado otras metodologías sobre estos organismos como en *Arenicola marina* la cual ha sido testeada en disoluciones ácidas (HNO₃), digiriendo al organismo completo dado su tamaño y sus tejidos blandos, obteniendo entre 1.2 - 2.8 partículas de microplásticos por gramo de peso húmedo (Wnag and Wang, 2018).

5.8. Cnidarios

El protocolo realizado por Gutovskaia (2019) utiliza ejemplares de cnidarios (*Mertensia ovum*, *Cyanea capillata* y *Aurelia aurita*) para realizar la caracterización de microplásticos, al digerir los ejemplares en una disolución de enzimas pancreáticas durante 48 h. con 5 mL de extracto por individuo. Dichas pruebas otorgaron resultados óptimos en el estudio, con una media de $1,9 \pm 0,5$ microplásticos por individuo digerido (Gutovskaia, 2019).

6. CONCLUSIONES

De los resultados obtenidos tras la revisión bibliográfica llevada a cabo para el presente Trabajo Fin de Grado, pueden extraerse las siguientes conclusiones:

- I. Tras analizar la producción científica respecto al uso de metodologías de digestión para la extracción de microplásticos en organismos marinos; puede contemplarse como un fenómeno reciente de los últimos 10 años, cuyo auge ha tenido lugar principalmente en 2019, llegando a triplicar la producción científica de los años anteriores.
- II. Según la bibliografía consultada, se han clasificado los diferentes protocolos de digestión en base a los grupos zoológicos presentes en las publicaciones. Los grupos más utilizados son teleósteos, moluscos y crustáceos, en 25, 22 y 14 publicaciones respectivamente. En estos grupos, predominan las metodologías alcalinas (KOH), ácidas (HNO₃) y oxidativas (H₂O₂) respectivamente.
- III. En menor medida se han empleado elasmobranquios, reptiles marinos, mamíferos marinos, anélidos y cnidarios. En éstos, las metodologías de extracción de microplásticos más empleadas son las alcalinas y las enzimáticas.
- IV. Las metodologías más utilizadas en el elasmobranquio *Scyliorhinus canicula* son aquellas basadas en el uso de KOH y NaOH; presentes en 3 publicaciones de las seleccionadas para el presente trabajo.
- V. Por ello, se propone la optimización de una metodología ya existente, empleando tractos gastrointestinales de *S. canicula*, y basada en una digestión con KOH al 10% y posterior separación por densidad con disolución hipersalina de NaCl.

7. LÍNEAS FUTURAS

A raíz del estudio bibliográfico llevado a cabo para el presente Trabajo Fin de Grado, se plantean distintas líneas de investigación:

- I. Optimización de una nueva metodología, ya planteada por Mancía *et al.* (2020) en *Scyliorhinus canicula*, empleando KOH (10%) en tractos gastrointestinales secados y posterior separación por densidad. Y propuesta de biomonitorización de la contaminación por microplásticos utilizando dicha especie.
- II. Análisis del uso de metodologías ácidas basadas en el uso de HNO₃, HCl o HNO₃:HClO₄ en la digestión de tractos intestinales en *Scyliorhinus canicula*.
- III. Análisis del uso de metodologías enzimáticas en la digestión de tractos gastrointestinales en *Scyliorhinus canicula*.
- IV. Revisión bibliográfica de los métodos de caracterización e identificación de microplásticos en *Scyliorhinus canicula*.

BIBLIOGRAFÍA

Abidli, S., Lahbib, Y., Trigui El Menif, N., (2019). Microplastics in commercial molluscs from the lagoon of Bizerte (Northern Tunisia). *Marine Pollution Bulletin*, 142, 243–252. doi:10.1016/j.marpolbul.2019.03.048

Akhbarizadeh, R., Moore, F., Keshavarzi, B., (2019). Investigating microplastics bioaccumulation and biomagnification in seafood from the Persian Gulf: a threat to human health? *Food Additives & Contaminants: Part A*, 1–13. <https://doi.org/10.1080/19440049.2019.1649473>

Akhbarizadeh, R., *et al.*, (2017). Microplastics and potentially toxic elements in coastal sediments of Iran's main oil terminal (Khark Island). *Environmental Pollution*, 220:720-731. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2016.10.038>

American Chemistry Council, Inc. (2020). *Life cycle of a plastic product*. Disponible en: <https://plastics.americanchemistry.com/Lifecycle-of-a-Plastic-Product/> [Consulta: 06-03-20]

Andrady, A.L., (2017). The plastic in microplastics: A review. *Marine Pollution Bulletin*, 119.1:12-22. <https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2017.01.082>

Andrady, A.L., (2011). Microplastic in marine environment. *Marine Pollution Bulletin*, 119.1:12-22. <https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2011.05.030>

Andrady, A.L., (2003)a. *Common plastics materials*, John Wiley & Sons, Inc., Hoboken, New Jersey.

Andrady, A.L., (2003)b. *Plastics and the Environment*. John Wiley & Sons, Inc., Hoboken, New Jersey.

Arossa, S., *et al.*, (2019). Microplastic removal by red sea giant clam (*Tridacna maxima*). *Environmental Pollution*. doi:10.1016/j.envpol.2019.05.149

Ataño-Barboza, L.G., *et al.*, (2018). Marine microplastic debris: An emerging issue for food security, food safety and human health. *Marine Pollution Bulletin*, 133, 336–348. <https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2018.05.047>

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>

Azizah, N., Saragih, G.S., (2019). Microplastics in digestive tracts of fishes from Jakarta Bay. *IOP Conference Series: Earth and Environmental Science*, West Java, Indonesia

Baechler, B.R., *et al.*, (2019). Microplastic occurrence and effects in commercially harvested North American finfish and shellfish: Current knowledge and future directions. *Limnology and Oceanography Letters*. <https://doi.org/10.1002/lol2.10122>

Barboza LGA, et al. Marine microplastic debris: An emerging issue for food security, food safety and human health. *Marine Pollution Bulletin*. 2018;133, 336–348.

Barboza, L.G., et al., (2020). Microplastics in wild fish from North East Atlantic Ocean and its potential for causing neurotoxic effects, lipid oxidative damage, and human health risks associated with ingestion exposure. *Science of the Total Environment*, 717: 134625. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2019.134625>

Barría, C., Navarro, J., Coll, M., (2018). Trophic habits of an abundant shark in the northwestern Mediterranean Sea using an isotopic non-lethal approach. *Estuarine, Coastal and Shelf Science*, 207: 383-390. <https://doi.org/10.1016/j.ecss.2017.08.021>

Baum, J., Worm, B., (2009). Cascading top-down effects of changing oceanic predator abundances. *Journal of Animal Ecology*, 78(4): 699-714. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2656.2009.01531.x>

Bayo, J., et al., (2020). Microplastic pollution on the strandline of urban and natural city beaches: the role of local activities. *International Journal of Environmental Impacts*. 3.2:155-167. <https://doi:10.2495/EI-V3-N2-155-167>

Bellas, J., et al., (2016). Ingestion of microplastics by demersal fish from the Spanish Atlantic and Mediterranean coasts. *Marine pollution bulletin*, 109.1: 55-60. <https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2016.06.026>

Bessa, F., et al., (2018). Occurrence of microplastics in commercial fish from a natural estuarine environment. *Marine pollution bulletin*, 128:575-584. <https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2018.01.044>

Bianchi, J., et al., (2020). Food preference determines the best suitable digestion protocol for analysing microplastic ingestion by fish. *Marine Pollution Bulletin*, 154:111050. <https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2020.111050>

Blair, R.M., et al., (2018). Secondary microplastics were prevalent in sediment in a freshwater UK urban river. *Environ Sci Pollut Res* 26, 12491–12504 <https://doi.org/10.1007/s11356-019-04678-1>

Bonanno, G., Orlando-Bonaca, M., (2018). Perspectives on using marine species as bioindicators of plastic pollution. *Marine pollution bulletin*, 137:209-221. <https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2018.10.018>

Boucher, J., Friot, D., (2017). Primary Microplastics in the Oceans: a Global Evaluation of Sources. Gland, Switzerland: IUCN. 43pp.

Brander, S.M., et al., (2015) *The ecotoxicology of plastic marine debris*. *The American biology Teacher*. University of California. Disponible en: <http://www.jstor.org/stable/10.1525/abt.2011.73.8.9> [Consultado en: 28-04-20]

Brennecke, D., *et al.*, (2016). Microplastics as vector for heavy metal contamination from the marine environment. *Estuarine, Coastal and Shelf Science*, 178:189-195. <https://doi.org/10.1016/j.ecss.2015.12.003>

Budimir, S., Setälä, O., Lehtiniemi, M., (2018). Effective and easy to use extraction method shows low numbers of microplastics in offshore planktivorous fish from the northern Baltic Sea. *Marine pollution bulletin*, 127:586-592. <https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2017.12.054>

Cantos, M.E., (2019). *Estudio de la contaminación marina por plásticos y evaluación de contaminantes derivados de su tratamiento. Tesis Doctoral*. Diss. Universidad de Alicante, Alicante.

Caron, A., *et al.*, (2018)a. Ingestion of microplastic debris by green sea turtles (*Chelonia mydas*) in the Great Barrier Reef: Validation of a sequential extraction protocol." *Marine pollution bulletin* 127: 743-751. <https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2017.12.062>

Caron, A., *et al.*, (2018)b. Validation of an optimised protocol for quantification of microplastics in heterogenous samples: A case study using green turtle chyme. *MethodsX* 5: 812-823. <https://doi.org/10.1016/j.mex.2018.07.009>

Caron, A., *et al.*, (2016). Extraction and identification of microplastics from sea turtles: method development and preliminary results. *Tropical Water Report No. 15/52*. TropWater.

Catarino, A., *et al.*, (2017). Development and optimization of a standard method for extraction of microplastics in mussels by enzyme digestion of soft tissues. *Environmental toxicology and chemistry*, 36(4): 947-951. <https://doi.org/10.1002/etc.3608>

Cau, A., *et al.*, (2019). Microplastics in the crustaceans *Nephrops norvegicus* and *Aristeus antennatus*: Flagship species for deep-sea environments?. *Environmental Pollution* 255: 113107. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2019.113107>

Chae, Y., Youn-Joo, A., (2020). Effects of food presence on microplastic ingestion and egestion in *Mytilus galloprovincialis*. *Chemosphere* 240: 124855. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2019.124855>

Chan, S.H., *et al.*, (2019). Evidence for non-selective ingestion of microplastic in demersal fish." *Marine pollution bulletin* 149: 110523. <https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2019.110523>

Catarino, A., *et al.*, (2017). Development and optimization of a standard method for extraction of microplastics in mussels by enzyme digestion of soft tissues. *Environmental toxicology and chemistry*, 36(4): 947-951. <https://doi.org/10.1002/etc.3608>

Chubarenko, I., *et al.*, (2020). On mechanical fragmentation of single-use plastics in the sea swash zone with different types of bottom sediments: insights from laboratory experiments. *Marine Pollution Bulletin*, 150: 110726. <https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2019.110726>

Chubarenko, I., *et al.* (2018). Behavior of Microplastics in Coastal Zones. *Microplastic Contamination in Aquatic Environments*, 175–223. <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-813747-5.00006-0>

Chubarenko, I., *et al.*, (2016). On some physical and dynamical properties of microplastic particles in marine environment. *Marine pollution bulletin*, 108.1-2: 105-112. <https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2016.04.048>

Claessens, M., *et al.*, (2013). New techniques for the detection of microplastics in sediments and field collected organisms. *Marine pollution bulletin*, 70.1-2: 227-233. <https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2013.03.009>

Cole, M., *et al.*, (2014). Isolation of microplastics in biota-rich seawater samples and marine organisms. *Scientific reports*. 2014;4: 4528. <https://doi.org/10.1038/srep04528>

Cole, M., *et al.*, (2013). Microplastic ingestion by zooplankton. *Environmental Science & Technology*, 47(12): 6646-6655. <https://doi.org/10.1021/es400663f>

Cole, M., *et al.*, (2011). *Microplastics as contaminants in the marine environment: A review.* *Marine Pollution Bulletin*, 62(12), 2588–2597. <https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2011.09.025>

Connie Ka Yan, Ng., *et al.*, (2016). Marine macrophytes and plastics consumed by green turtles (*Chelonia mydas*) in Hong Kong, South China Sea region. *Chelonian Conservation and Biology*, 15.2: 289-292. <https://doi.org/10.2744/CCB-1210.1>

Courtene-Jone, W., *et al.*, (2017). Optimisation of enzymatic digestion and validation of specimen preservation methods for the analysis of ingested microplastics. *Analytical Methods*, 9.9: 1437-1445. <https://doi.org/10.1039/c6ay02343f>

Cózar, A., *et al.* (2014). Plastic debris in the open ocean. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 111(28), 10239–10244. <https://doi.org/10.1073/pnas.1314705111>

Crawford, C.B., and Quinn, B., (2019). *Microplastic Pollutants*, 1^a Edición, Amsterdam: Elsevier.

Davidson, K., Dudas, S.E., (2016). Microplastic Ingestion by Wild and Cultured Manila Clams (*Venerupis philippinarum*) from Baynes Sound, British Columbia. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, 71(2), 147–156. [doi:10.1007/s00244-016-0286-4](https://doi.org/10.1007/s00244-016-0286-4)

De Vries, A.N., *et al.*, (2020). Microplastic ingestion by fish: Body size, condition factor and gut fullness are not related to the amount of plastics consumed. *Marine Pollution Bulletin*, 151:110827. <https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2019.110827>

Dehaut, A., *et al.*, (2016). Microplastics in seafood: Benchmark protocol for their extraction and characterization. *Environmental Pollution*, 215: 223-233. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2016.05.018>

Derraik, J.G., (2002). The pollution of the marine environment by plastic debris: a review. *Marine Pollution Bulletin*, 44(9), 842–852. [https://doi.org/10.1016/s0025-326x\(02\)00220-5](https://doi.org/10.1016/s0025-326x(02)00220-5)

Desforges, J.P., Galbraith, M., Ross, P., (2015). Ingestion of microplastics by zooplankton in the Northeast Pacific Ocean. *Archives of environmental contamination and toxicology*, 69.3:320-330. <https://doi.org/10.1007/s00244-015-0172-5>

Devriese, L., *et al.*, (2015). Microplastic contamination in brown shrimp (*Crangon crangon*, Linnaeus 1758) from coastal waters of the Southern North Sea and Channel area. *Marine Pollution Bulletin*, 98.1-2: 179-187. <http://dx.doi.org/10.1016/j.marpolbul.2015.06.051>

Di Renzo, L., *et al.*, (2019). Extraction Protocol Optimization for Detection of Microplastics in Digestive System Contents of Loggerhead Turtle (*Caretta Caretta*). *International Conference on Microplastic Pollution in the Mediterranean Sea*. ICMPPMS. Springer, Cham.

Digka, N., *et al.*, (2018). Microplastics in mussels and fish from the Northern Ionian Sea. *Marine pollution bulletin*, 135: 30-40. <https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2018.06.063>

Ding, J.F., *et al.*, (2018). Separation and Identification of Microplastics in Digestive System of Bivalves. *Chinese Journal of Analytical Chemistry*, 46(5), 690–697. doi:10.1016/s1872-2040(18)61086-2

Doyle, D., *et al.*, (2019). Low levels of microplastics recorded from the common periwinkle, *Littorina littorea* on the west coast of Ireland. *Marine Pollution Bulletin*, 149, 110645. doi:10.1016/j.marpolbul.2019.110645

Elijah-Nathaniel, W., (2014). *Development and use of a tissue-destruction method to extract microplastics in blue crabs (Callinectes sapidus)*, *Environmental Science*. Tesis Doctoral BS, Oregon State University, Texas.

Enders, K., *et al.*, (2020). When every particle matters: a quechers approach to extract microplastics from environmental samples. *MethodsX*, 100784. <https://doi.org/10.1016/j.mex.2020.100784>

Enders, K., *et al.*, (2016). Extraction of microplastic from biota: recommended acidic digestion destroys common plastic polymers. *ICES Journal of Marine Science: Journal Du Conseil*. <https://doi.org/10.1093/icesjms/fsw173>

Estahbanati, S., Fahrenfeld, N.L., (2016). Influence of wastewater treatment plant discharges on microplastic concentrations in surface water. *Chemosphere*, 162, 277–284. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2016.07.083>

Everaert, G., *et al.*, (2018). Risk assessment of microplastics in the ocean: Modelling approach and first conclusions. *Environmental Pollution*. 242: 1930-1938. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2018.07.069>

Fernández-Severini, M.D., *et al.*, (2019). Microplastics in oysters (*Crassostrea gigas*) and water at the Bahía Blanca Estuary (Southwestern Atlantic): An emerging issue of global concern. *Regional Studies in Marine Science*, 100829. doi:10.1016/j.rsma.2019.100829

Foekema, E.M., *et al.*, (2013). Plastic in north sea fish. *Environmental science & technology* 47.15: 8818-8824. ttps://doi.org/10.1021/es400931b

Fossi, M.C., *et al.*, (2018). Bioindicators for monitoring marine litter ingestion and its impacts on Mediterranean biodiversity. *Environmental Pollution*, 237:1023-1040. https://doi.org/10.1016/j.envpol.2017.11.019

Fossi, M.C., *et al.*, (2014). Large filter feeding marine organisms as indicators of microplastic in the pelagic environment: the case studies of the Mediterranean basking shark (*Cetorhinus maximus*) and fin whale (*Balaenoptera physalus*). *Marine environmental research*, 100:17-24. https://doi.org/10.1016/j.marenvres.2014.02.002

Galgani, F., Hanke, G., Maes, T., (2015). Global Distribution, Composition and Abundance of Marine Litter. *Marine Anthropogenic Litter*, 29–56. https://doi:10.1007/978-3-319-16510-3_2

Galloway, T.S., Cole, M., Lewis, C., (2017). Interactions of microplastic debris throughout the marine ecosystem. *Nature Ecology & Evolution*, 1(5). https://doi:10.1038/s41559-017-0116

Germanov, E.S., *et al.*, (2018). Microplastics: No Small Problem for Filter-Feeding Megafauna. *Trends in Ecology & Evolution*, 33(4), 227–232. https://doi:10.1016/j.tree.2018.01.005

Giani, D., *et al.*, (2019). Microplastics occurrence in edible fish species (*Mullus barbatus* and *Merluccius merluccius*) collected in three different geographical sub-areas of the Mediterranean Sea. *Marine pollution bulletin*, 140:129-137. https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2019.01.005

Gourmelon, G., (2015): *Global plastic production rises, recycling lags. New Worldwatch Institute analysis explores trends in global plastic consumption and recycling.* Disponible en: <http://www.worldwatch.org> 208 [Consulta:23-04-20]

Graham, P., *et al.*, (2019). Microplastics uptake and egestion dynamics in Pacific oysters, *Magallana gigas* (Thunberg, 1793), under controlled conditions. *Environmental pollution* 252: 742-748. https://doi.org/10.1016/j.envpol.2019.06.002

Gubili, C., *et al.*, (2014). A tale of two seas: contrasting patterns of population structure in the small-spotted catshark across Europe. *Royal Society open science*, 1.3:140175. https://doi.org/10.1098/rsos.140175

Gutovskaia, E., (2019). Optimization of extraction method for microplastic from invertebrates using pancreatic enzymes. *Environmental engineering*. Doctoral Tesis, South-Eastern Finland University of Applied Sciences, Finland

Gutow, L., *et al.*, (2015). Experimental Evaluation of Seaweeds as a Vector for Microplastics into Marine Food Webs. *Environmental Science & Technology*, 50(2), 915–923. <https://doi:10.1021/acs.est.5b02431>

Guzzetti, E., *et al.*, (2018). Microplastic in marine organism: Environmental and toxicological effects. *Environmental toxicology and pharmacology*, 64: 164-171. <https://doi.org/10.1016/j.etap.2018.10.009>

Hammer, J., Kraak, MH., Parsons, JR., (2012). Plastics in the Marine Environment: The Dark Side of a Modern Gift. *Reviews of Environmental Contamination and Toxicology*. Springer, New York, 1–44. https://doi.org/10.1007/978-1-4614-3414-6_1

Hammer J, Kraak MHS, Parsons JR. Plastics in the Marine Environment: The Dark Side of a Modern Gift. *Reviews of Environmental Contamination and Toxicology*. 2012;1–44.

Hará, J., Frias, J., Nash, R., (2020). Quantification of microplastic ingestion by the decapod crustacean *Nephrops norvegicus* from Irish waters. *Marine Pollution Bulletin* 152: 110905. <https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2020.110905>

Harris, M.E., Walker, B., (2010). A Novel, Simplified Scheme for Plastics Identification. *Journal of Chemical Education*, 87(2), 147–149. <https://doi:10.1021/ed800055p>

Helm, P.A., (2017). Improving microplastics source apportionment: a role for microplastic morphology and taxonomy? *Analytical Methods*, 9(9), 1328–1331. <https://doi:10.1039/c7ay90016c>

Hossain, M.S., *et al.*, (2020). Microplastic contamination in Penaeid shrimp from the Northern Bay of Bengal. *Chemosphere* 238: 124688. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2019.124688>

Hossain, M.S., *et al.*, (2019). Microplastics in fishes from the Northern Bay of Bengal. *Science of The Total Environment*, 690:821-830. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2019.07.065>

Hueter, R.E., *et al.*, (2005). Evidence of philopatry in sharks and implications for the management of shark fisheries. *Journal of northwest atlantic fishery Science*, 35:239-247.

ICES (2015). ICES Special Request Advice Northeast Atlantic and Arctic Ocean. OSPAR request on development of a common monitoring protocol for plastic particles in fish stomachs and selected shellfish on the basis of existing fish disease surveys. ICES Advice, Book 1 (June), 1–6.

Ika, P.P., *et al.*, (2016). Exposure of marine mussels *Mytilus* spp. to polystyrene microplastics: toxicity and influence on fluoranthene bioaccumulation. *Environmental pollution*, 216:724-737. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2016.06.039>

Iñiguez-Cantos, M.E., (2019). *Estudio de la contaminación marina por plásticos y evaluación de contaminantes derivados de su tratamiento*. Tesis Doctoral, Universidad de Alicante, Alicante.

Jaikumar, G., *et al.*, (2019). Reproductive toxicity of primary and secondary microplastics to three cladocerans during chronic exposure. *Environmental pollution*, 249:638-646. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2019.03.085>

Jiang, J.Q., (2018). Occurrence of microplastics and its pollution in the environment: A review. *Sustainable Production and Consumption*, 13, 16–23. <https://doi.org/10.1016/j.spc.2017.11.003>

Karami, A., *et al.*, (2017). A high-performance protocol for extraction of microplastics in fish. *Science of the Total Environment*, 578: 485-494. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2016.10.213>

Karbalaei, S., *et al.*, (2019). Abundance and characteristics of microplastics in commercial marine fish from Malaysia. *Marine pollution bulletin*, 148:5-15. <https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2019.07.072>

Karlsson, T.M., *et al.*, (2017). Screening for microplastics in sediment, water, marine invertebrates and fish: Method development and microplastic accumulation. *Marine Pollution Bulletin*, 122(1-2): 403–408. <https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2017.06.081>

Keisling, C., *et al.*, (2020). Low concentrations and low spatial variability of marine microplastics in oysters (*Crassostrea virginica*) in a rural Georgia estuary. *Marine pollution bulletin* 150: 110672. <https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2019.110672>

Kousteni, V., Karachle, P.K., Megalofonou, P., (2017). Diet of the small-spotted catshark *Scyliorhinus canicula* in the Aegean Sea (eastern Mediterranean). *Marine Biology Research*, 13.2:161-173. <https://doi.org/10.1080/17451000.2016.1239019>

La Mantia, F.P., *et al.*, (2017). Degradation of polymer blends: A brief review. *Polymer Degradation and Stability*, 145, 79–92. <https://doi.org/10.1016/j.polymdegradstab.2017.07.011>

Lebreton, L., Andrady, A., (2019). Future scenarios of global plastic waste generation and disposal. *Palgrave Commun* 5, 6. <https://doi.org/10.1057/s41599-018-0212-7>

Lee, J., *et al.*, (2013). Relationships among the abundances of plastic debris in different size classes on beaches in South Korea. *Marine Pollution Bulletin*, 77(1-2), 349–354. <https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2013.08.013>

Lehtiniemi, M., *et al.*, (2018). Size matters more than shape: Ingestion of primary and secondary microplastics by small predators. *Food webs*, 17: e00097. <https://doi.org/10.1016/j.fooweb.2018.e00097>

Lei, L., *et al.*, (2018). Microplastic particles cause intestinal damage and other adverse effects in zebrafish *Danio rerio* and nematode *Caenorhabditis elegans*. *Science of the Total Environment*, 619: 1-8. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2017.11.103>

Leslie, H.A., (2014). *Review of microplastics in cosmetics. Scientific background on a potential source of plastic particulate marine litter to support decision-making.* IVM Institute for Environmental Studies 476:1-33.

Li, J., *et al.*, (2018). Using mussel as a global bioindicator of coastal microplastic pollution. *Environmental Pollution*. doi:10.1016/j.envpol.2018.10.032

Li, J., *et al.*, (2015). Microplastics in commercial bivalves from China. *Environmental Pollution*, 207, 190–195. doi:10.1016/j.envpol.2015.09.018

Liu, M., (2020). *Analytical Methods for Microplastics in Environments: Current Advances and Challenges.* The Handbook of Environmental Chemistry. Springer, Berlin, Heidelberg

Löder, M., *et al.*, (2017). Enzymatic purification of microplastics in environmental samples. *Environ. Sci. Technol*, 51, 14283–14292. <https://doi.org/10.1021/acs.est.7b03055>

Löder, Martin GJ, and Gunnar Gerdt. Methodology used for the detection and identification of microplastics—A critical appraisal. *Marine anthropogenic litter*. Springer, Cham. 2015. 201-227.

Lusher, A., Hernandez-Milian, G., (2018). Microplastic extraction from marine vertebrate digestive tracts, regurgitates and scats: a protocol for researchers from all experience levels. *Bio-protocol*, 8.22. <https://doi:10.21769/BioProtoc.3086>

Lusher, A., *et al.*, (2017)^a. Sampling, isolating and identifying microplastics ingested by fish and invertebrates. *Analytical Methods*, 9,1346–1360. <https://doi:10.1039/C6AY02415G>

Lusher, A., *et al.*, (2017)^b. Testing of methodology for measuring microplastics in blue mussels (*Mytilus spp*) and sediments, and recommendations for future monitoring of microplastics (R & D-project). Norsk institutt for vannforskning.

Lusher, A., (2015). Microplastics in the Marine Environment: Distribution, Interactions and Effects. *Marine Anthropogenic Litter*, 245–307. https://doi:10.1007/978-3-319-16510-3_10

Maddah, H.A., (2016). Polypropylene as a promising plastic: A review. *American Journal of Polymer Science*. 6.1: 1-11. <https://doi:10.5923/j.ajps.20160601.01>

Mancia, A., *et al.*, (2020). Adverse effects of plastic ingestion on the Mediterranean small-spotted catshark (*Scyliorhinus canicula*). *Marine Environmental Research*, 104876. <https://doi.org/10.1016/j.marenvres.2020.104876>

Miller, M.E., Frederieke, J.K., Cherie, A.M., (2017). Recovering microplastics from marine samples: A review of current practices. *Marine pollution bulletin*, 123,1-2: 6-18 <https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2017.08.058>

Moore, C.J., (2008). Synthetic polymers in the marine environment: A rapidly increasing, long-term threat. *Environmental Research*, 108(2), 131–139. <https://doi:10.1016/j.envres.2008.07.025>

Morét-Ferguson, S., *et al.*, (2010). The size, mass, and composition of plastic debris in the western North Atlantic Ocean. *Marine Pollution Bulletin*. 60.10:1873-1878. <https://doi:10.1016/j.marpolbul.2010.07.020>

Muenmee, S., Chiemchaisri, W., Chiemchaisri, C., (2015). Microbial consortium involving biological methane oxidation in relation to the biodegradation of waste plastics in a solid waste disposal open dump site. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 102, 172–181. <https://doi:10.1016/j.ibiod.2015.03.015>

Munno, K., *et al.*, (2018). Impacts of temperature and selected chemical digestion methods on microplastic particles. *Environmental toxicology and chemistry*, 37.1:91-98. <https://doi.org/10.1002/etc.3935>

Naidoo, T., Thompson, R.C., Rajkaran, A., (2020). Quantification and characterisation of microplastics ingested by selected juvenile fish species associated with mangroves in KwaZulu-Natal, South Africa. *Environmental Pollution*, 257:113635. <https://doi.org/10.1016/j.rsma.2019.100900>

Naidoo, T., Goordiyal, K., Glassom, D., (2017). Are Nitric Acid (HNO₃) Digestions Efficient in Isolating Microplastics from Juvenile Fish?. *Water, Air, & Soil Pollution*, 228.12: 470. <https://doi.org/10.1007/s11270-017-3654-4>

Naidu, S.A., (2019). Preliminary study and first evidence of presence of microplastics and colorants in green mussel, *Perna viridis* (Linnaeus, 1758), from southeast coast of India. *Marine pollution bulletin* 140: 416-422. <https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2019.01.024>

Nelms, S.E., *et al.*, (2018). Investigating microplastic trophic transfer in marine top predators. *Environmental Pollution*, 238: 999-1007. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2018.02.016>

Olaso, I., *et al.*, (2005). Trophic relations of lesser-spotted catshark (*Scyliorhinus canicula*) and blackmouth catshark (*Galeus melastomus*) in the Cantabrian Sea. *Journal of Northwest Atlantic Fishery Science*, 35:481-494.

Pešić, N., *et al.*, (2016). Mechanical properties of concrete reinforced with recycled HDPE plastic fibres. *Construction and Building Materials*, 115, 362–370. <https://doi.org/10.1016/j.conbuildmat.2016.04.050>

Phuong, N.N., *et al.*, (2018). Quantification and characterization of microplastics in blue mussels (*Mytilus edulis*): protocol setup and preliminary data on the contamination of the French Atlantic coast. *Environ Sci Pollut Res* 25, 6135–6144. <https://doi.org/10.1007/s11356-017-8862-3>

Piarulli, S., *et al.*, (2019). Microplastic in wild populations of the omnivorous crab *Carcinus aestuarii*: A review and a regional-scale test of extraction methods, including microfibrils. *Environmental pollution*, 251:117-127. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2019.04.092>

Pullen, E.V., (2019). *Microplastics in the Digestive System of the Atlantic Sharpnose Shark (Rhizoprionodon terraenovae) in Winyah Bay, SC*. Electronic Theses and Dissertations. 110. Disponible en: <https://digitalcommons.coastal.edu/etd/110> [Consultado: 02-05-20]

Qiao, R., *et al.*, (2019). Accumulation of different shapes of microplastics initiates intestinal injury and gut microbiota dysbiosis in the gut of zebrafish. *Chemosphere*, 236, 124334. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2019.07.065>

Ray, S., Cooney, R.P., (2018). Thermal Degradation of Polymer and Polymer Composites. *Handbook of Environmental Degradation of Materials*, 185–206. <https://doi.org/10.1016/b978-0-323-52472-8.00009-5>

Reguera, P., Viñas, L., Gago, J., (2019). Microplastics in wild mussels (*Mytilus spp.*) from the north coast of Spain. *Scientia Marina*, 83.4:337-347. <https://doi.org/10.3989/scimar.04927.05A>

Ribeiro, F., *et al.*, (2017). Microplastics effects in *Scrobicularia plana*. *Marine pollution bulletin*, 122.1-2:379-391. <https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2017.06.078>

Ritchie, H., Roser, M., (2020). *Plastic Pollution*. Disponible en: <https://ourworldindata.org/plastic-pollution> [Consulta:23-04-20]

Roch, S., Brinker, A., (2017). Rapid and efficient method for the detection of microplastic in the gastrointestinal tract of fishes. *Environmental science & technology*, 51.8:4522-4530. <https://doi.org/10.1021/acs.est.7b00364>

Rodrigues, J.P., *et al.*, (2019). Significance of interactions between microplastics and POPs in the marine environment: a critical overview. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 111:252-260. <https://doi.org/10.1016/j.trac.2018.11.038>

Rodriguez-Cabello, C., *et al.*, (2005). Survival of small-spotted catshark (*Scyliorhinus canicula*) discarded by trawlers in the Cantabrian Sea. Marine Biological Association of the United Kingdom. *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom*, 85.5: 1145.

Ruckstuhl, K., Neuhaus, P., (2006). Sexual segregation in vertebrates. Cambridge University Press.

Ryan, P.G., (2016). *Ingestion of Plastics by Marine Organisms*. Hazardous Chemicals Associated with Plastics in the Marine Environment, 1ª Edición, The Handbook of Environmental Chemistry, vol 78. Springer, Cham

Schirinzi, G.F., *et al.*, (2020). A new digestion approach for the extraction of microplastics from gastrointestinal tracts (GITs) of the common dolphinfish (*Coryphaena hippurus*) from the western Mediterranean Sea. *Journal of Hazardous Materials*, 122794. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2020.122794>

Segura, D., Noguez, R., Guadalupe, E., (2007). Contaminación ambiental y bacterias productoras de plásticos biodegradables. *Biotecnología*. 14.C23:361-371.

Sheavly, S.B., Register, K.M., (2007). Marine Debris & Plastics: Environmental Concerns, Sources, Impacts and Solutions. *Journal of Polymers and the Environment*, 15(4), 301–305. <https://doi.org/10.1007/s10924-007-0074-3>

Sims, D.W., (2003). Tractable models for testing theories about natural strategies: foraging behaviour and habitat selection of free-ranging sharks. *Journal of fish biology*, 63:53-73. <https://doi.org/10.1111/j.1095-8649.2003.00207.x>

Smith, L.E., (2018). Plastic ingestion by *Scyliorhinus canicula* trawl captured in the North Sea. *Marine Pollution Bulletin*, 130, 6–7. <https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2018.03.001>

Stock, F., *et al.*, (2019). Sampling techniques and preparation methods for microplastic analyses in the aquatic environment: A review. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*. <https://doi.org/10.1016/j.trac.2019.01.014>

Sun, X., *et al.*, (2019). Characteristics and retention of microplastics in the digestive tracts of fish from the Yellow Sea. *Environmental pollution*. 249:878-885. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2019.01.110>

Syakti, A.D., (2017). Microplastics monitoring in marine environment. *Omni-Akuatika* 13.2. <http://dx.doi.org/10.20884/1.oa.2017.13.2.430>

Szyszkowska, A., Dagmara, G., (2017). Properties, application and degradation of plastics. *NAFTA*, 9:20. <https://doi.org/10.24131/3247.170107>

Tchounwou, P.B., *et al.*, (2012). *Heavy metal toxicity and the environment*. *Molecular, Clinical and Environmental Toxicology*, Volume 3: Environmental Toxicology. A. Luch. 133-164.

Thiele, C.J., *et al.*, (2019). Evaluation of existing methods to extract microplastics from bivalve tissue: Adapted KOH digestion protocol improves filtration at single-digit pore size. *Marine Pollution Bulletin*, 142, 384–393. [doi:10.1016/j.marpolbul.2019.03.003](https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2019.03.003)

- Tigănuș, M.D., et al. (2019). Current Knowledge of Methods for Assessing Surface Water Pollution with Microplastics and their Impact on Aquatic Species. *Scientific Annals of the Danube Delta Institute*. Vol 24 <https://doi.org/10.7427/DDI.24.13>
- Tongesayi, T., Tongesayi, S., (2015). Contaminated Irrigation Water and the Associated Public Health Risks. *Food, Energy, and Water*, 349–381. <https://doi:10.1016/b978-0-12-800211-7.00013-2>
- Turner, A., Wallerstein, C., Arnold, R., (2019). Identification, origin and characteristics of bio-bead microplastics from beaches in western Europe. *Science of The Total Environment*, 664: 938-947. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2019.01.281>
- Valente, T., et al., (2019). Exploring microplastic ingestion by three deep-water elasmobranch species: A case study from the Tyrrhenian Sea. *Environmental Pollution*, 253:342-350. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2019.07.001>
- Van der Vegt, A.K., (2006). *From polymers to plastics*, 1^a Edición, The Netherlands VSSD.
- Vandermeersch, G., et al., (2015). A critical view on microplastic quantification in aquatic organisms. *Environmental Research*, 143: 46-55. <https://doi.org/10.1016/j.envres.2015.07.016>
- Verlaan, M.P., et al., (2019). Abundance of microplastics in the gastrointestinal tracts of the eelpout (*Zoacres viviparous* L.) collected in Roskilde Fjord, Denmark: Implications for use as a monitoring species under the Marine Strategy Framework Directive. *Regional Studies in Marine Science*, 32:100900. <https://doi.org/10.1016/j.rsma.2019.100900>
- von Friesen, L.W., et al., (2019). An efficient and gentle enzymatic digestion protocol for the extraction of microplastics from bivalve tissue. *Marine pollution bulletin* 142: 129-134. <https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2019.03.016>
- Wagner, J., et al., (2017). Novel method for the extraction and identification of microplastics in ocean trawl and fish gut matrices. *Analytical Methods*, 9.9:1479-1490. <https://doi:10.1039/c6ay02396g>
- Wang, J., et al., (2016). The behaviors of microplastics in the marine environment. *Marine Environmental Research*, 113: 7-17. <https://doi.org/10.1016/j.marenvres.2015.10.014>
- Wang, W., Wang, J., (2018). Investigation of microplastics in aquatic environments: An overview of the methods used, from field sampling to laboratory analysis. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 108:195-202. <https://doi.org/10.1016/j.trac.2018.08.026>
- Webb, S., et al., (2019). Microplastics in the New Zealand green lipped mussel *Perna canaliculus*. *Marine Pollution Bulletin* 149: 110641. <https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2019.110641>

Wesch, C., *et al.*, (2016). Towards the suitable monitoring of ingestion of microplastics by marine biota: A review. *Environmental Pollution*, 218, 1200–1208. doi:10.1016/j.envpol.2016.08.076

White, J.R., Turnbull, A., (1994). Weathering of polymers: mechanisms of degradation and stabilization, testing strategies and modelling. *Journal of Materials Science*, 29, 584–613. <https://doi.org/10.1007/BF00445969>

Williams, A.T., Rangel-Buitrago, N., (2019). Marine litter: Solutions for a major environmental problem. *Journal of coastal research*, 35.3: 648-663. <https://doi.org/10.2112/JCOASTRES-D-18-00096.1>

Woods, M., *et al.*, (2018). Microplastic fiber uptake, ingestion, and egestion rates in the blue mussel (*Mytilus edulis*). *Marine Pollution Bulletin*, 137, 638–645. doi:10.1016/j.marpolbul.2018.10.061

Wright, S.L., Thompson, R.C., Galloway, T.S., (2013). The physical impacts of microplastics on marine organisms: a review. *Environmental pollution*, 178: 483-492 <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2013.02.031>

Wu, W.M., Yang, J., Criddle, C.S., (2016). Microplastics pollution and reduction strategies. *Frontiers of Environmental Science & Engineering*, 11(1). <https://doi.org/10.1007/s11783-017-0897-7>

Xu, Q., *et al.*, (2020). An effective method for evaluation of microplastic contaminant in gastropod from Taihu Lake, China. *Environmental Science and Pollution Research*. doi:10.1007/s11356-020-08747-8

Xu, X., *et al.*, (2020). Microplastics in invertebrates on soft shores in Hong Kong: Influence of habitat, taxa and feeding mode. *Science of the Total Environment* 715: 136999. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.136999>

Zhang, D., *et al.*, (2020). Microplastic pollution in deep-sea sediments and organisms of the Western Pacific Ocean. *Environmental Pollution* 113948. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2020.113948>

Zhao, Y., *et al.*, (2019). Data on microplastics in the digestive tracts of 19 fish species from the Yellow Sea, China. *Data in brief*. 25: 103989. <https://doi.org/10.1016/j.dib.2019.103989>

Zhu, L., *et al.*, (2019). Microplastic ingestion in deep-sea fish from the South China Sea. *Science of The Total Environment*, 677:493-501. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2019.04.380>