

Universidad de los Andes

Facultad de Ingeniería

Departamento de Ingeniería Civil y Ambiental

ICYA3103 – Proyecto de Grado en Ingeniería Ambiental

**Propuesta de investigación para la detección y cuantificación de microplásticos en agua embotellada por métodos de tinción de Nilo Rojo y espectroscopia Raman**

Autor: María Paula Santofimio González

Asesor: Jaime Guillermo Plazas Tuttle, PhD.

Bogotá D.C

Junio 2020

## **RESUMEN**

La alta resistencia y no-degradación del plástico ha provocado que fragmentos de escala micrométrica de este material contaminen ecosistemas atmosféricos, marinos y terrestres, alcanzando el agua embotellada de consumo humano. Estudios recientes en Europa y Norteamérica han cuantificado concentraciones de microplásticos (MPs) de hasta 54,200,000 partículas/L (p/L) en botellas de agua, principalmente de materiales como tereftalato de polietileno (PET), polipropileno (PP) y poliestireno (PS). No obstante, se desconoce el estado de los niveles de MPs en Colombia en agua embotellada, así como las afectaciones de envases diferentes al plástico o vidrio, como bolsas de polietileno de baja densidad (LDPE por sus siglas en inglés). El objetivo de esta propuesta de investigación es identificar el tipo y la cantidad de MPs presentes en agua embotellada de la ciudad de Bogotá, utilizando las técnicas de tinción con Nilo Rojo (NR) y de análisis con espectroscopia Raman (ER) para cuantificar y caracterizar los polímeros encontrados. De esta manera, se podrá determinar la posible proveniencia de estos fragmentos plásticos, los cuales pueden ser causados por desgaste de la botella, contaminación desde las plantas de embotellado o desde la misma fuente hídrica. Los resultados de este estudio pueden contribuir a la normatividad de calidad del agua de MPs, así como la toma de medidas contingentes por instituciones de la salud para evitar afectaciones por parte de los polímeros en el cuerpo humano.

## TABLA DE CONTENIDO

RESUMEN .....	2
1. INTRODUCCIÓN .....	4
2. MATERIALES Y MÉTODOS .....	6
2.1 Recolección de datos .....	6
2.2 Materiales .....	7
2.3 Protocolo de toma de muestras .....	8
2.4 Protocolo de limpieza y filtración.....	9
2.5 Blancos .....	10
2.6 Técnicas de análisis y caracterización .....	10
2.6.1 Microscopia de fluorescencia.....	10
2.6.2 Espectroscopia Raman .....	11
2.7 Tratamiento estadístico .....	13
3. RESULTADOS ESPERADOS Y DISCUSIÓN.....	15
4. CONCLUSIONES .....	20
5. REFERENCIAS .....	22
6. ANEXOS.....	26

## 1. INTRODUCCIÓN

El plástico es considerado como uno de los materiales introducidos por el hombre para permitir el desarrollo humano durante el Antropoceno (Trischler, 2016). Características como alta durabilidad, bajo costo de producción, versatilidad y resistencia a la degradación hacen que este material sea esencial en industrias automotrices, de construcción, inmueble, y principalmente, en industrias de recipientes desechables de consumo masivo como alimentos y bebidas (Geyer, et al., 2017); aproximadamente el 30 % de la producción mundial de plástico es utilizada en la fabricación de estos envases (UN Environment, 2018). No obstante, la falta de gestión de los residuos desechables de plástico hace que factores climáticos como el viento y la lluvia erosionen este material, generando como consecuencia microplásticos (MPs), fragmentos del polímero con tamaños menores a 5 mm (Jiang, 2018).

El primer estudio de cuantificación de gránulos plásticos en el mar de los Sargazos dio paso a ampliar la investigación de MPs en la atmósfera, en ecosistemas terrestres y de agua dulce, evidenciando la contaminación ubicua a partir de estos residuos (Cai et al., 2017; Carpenter & Smith, 1972; Wagner & Lambert, 2018). La presencia de MPs en sistemas lénticos y lóticos de agua dulce ha alcanzado la cadena alimenticia humana, contaminando los animales marinos, el azúcar, la sal, se ha encontrado en productos líquidos como la cerveza, la leche, y con mayor preocupación, en las fuentes de agua para el consumo humano (Koelmans et al., 2019; Kutralam-Muniasamy et al., 2020; Liebezeit & Liebezeit, 2013, 2014; Peixoto et al., 2019; Smith et al., 2018). En estudios desarrollados en agua del grifo, se han detectado hasta 60 partículas/L (p/L) de MPs, y hasta 293 p/L en agua recién potabilizada (Kosuth, Mason, & Wattenberg, 2018; Pivokonsky et al., 2018). De hecho, un reciente estudio ejecutado en la ciudad de México, registró en promedio  $18 \pm 7$  p/L de MPs en el sistema de provisión de agua por bebedero del metro de la ciudad (Shruti, et al., 2020). Sin embargo, está comprobado que la cantidad de microplásticos en agua embotellada es mayor que en agua de grifo (Cox et al., 2019). Recientes investigaciones desarrolladas en Alemania acerca de la cuantificación de MPs en agua de botellas plásticas, han arrojado concentraciones entre  $0.6 \mu\text{g/L}$  y  $7.3 \mu\text{g/L}$

(aproximadamente  $118 \pm 88$  p/L) en envases retornables plásticos y valores entre  $0.1 \mu\text{g/L}$  y  $1.8 \mu\text{g/L}$  ( $14 \pm 14$  p/L) en botellas de plástico de un solo uso, con tamaños de partícula entre  $1.5$  y  $100 \mu\text{m}$  (Oßmann, et al., 2018; Schymanski, et al., 2018). También se han obtenido concentraciones en un rango entre  $0$  y  $10,930$  p/L de MPs en botellas de agua provenientes de Brasil, Estados Unidos, China, México e India (Mason, et al., 2018). Los anteriores análisis fueron realizados a partir de espectroscopia de transmisión de infrarrojo por transformación de Fourier (FTIR, por sus siglas en inglés) y de espectroscopia Raman (ER), métodos precisos en la caracterización de partículas mayores a  $1 \mu\text{m}$  (Ball et al., 2019; Lenz, et al., 2015). La visualización de partículas a través de los anteriores métodos es reforzada por técnicas de tinción, como el Nilo Rojo (NR) o Bengala Rosa, para identificar en menor tiempo y con mayor exactitud los MPs (Erni-Cassola, et al., 2017; Maes, et al., 2017). Otras técnicas de detección se han utilizado en Italia utilizando un Microscopio Electrónico de Barrido (MEB), obteniendo resultados de hasta  $54,200,000 \pm 19,500,000$  p/L de MPs (Zuccarello et al., 2019).

A pesar de que en la costa Atlántica de Colombia se han desarrollado estudios para cuantificar MPs de tereftalato de polietileno (PET por sus siglas en inglés) y de polipropileno (PP) (Acosta-Coley et al., 2019), así como de otros 19 tipos de MPs en especies endémicas de estuarios (Calderon et al., 2019), no existen estudios de detección y cuantificación de MPs de agua embotellada en el país. Sumado a esto, sólo se han llevado a cabo 4 investigaciones en el mundo sobre la determinación de estos residuos plásticos, todos realizados en países de Europa, o utilizando muestras de Norteamérica o Asia (Mason et al., 2018; Oßmann et al., 2018; Schymanski et al., 2018; Zuccarello et al., 2019). Además, en ninguna de estas investigaciones se ha considerado dentro de las muestras el agua comercializada en bolsas de polietileno de baja densidad (LDPE por sus siglas en inglés), pues se limitan a envases plásticos de un solo uso, retornables y de vidrio.

Por lo anterior, esta propuesta de trabajo de investigación tiene como objetivo principal la examinación de la posible presencia de MPs en agua de comercialización en recipientes de plástico, bolsa y vidrio para el consumo humano en Bogotá. El estudio se realizaría a partir de una caracterización cuantitativa y cualitativa de MPs en las botellas de muestreo, para especificar la cantidad y el tipo de MPs en los envases de análisis. También se espera analizar la procedencia de los MPs que ocasionan una mayor concentración de partículas de plástico en el agua examinada. Así, el trabajo de investigación contribuiría a conocer la exposición humana ante los MPs por su consumo en Bogotá, siendo esta una razón de estudio por su afectación en la salud; se estima que, en promedio, una persona puede ingerir hasta 52,000 MPs al año (Cox et al., 2019). Algunas de las afectaciones pueden darse por la ingestión en el sistema gastrointestinal, irritaciones respiratorias, enfermedades cardiovasculares, asma, cáncer, tos, obesidad e infertilidad (GESAMP, 2015; Karbalaei, Hanachi, TR, & Cole, 2018; Sharma & Chatterjee, 2017). Conjuntamente, los resultados arrojados por esta investigación pueden impulsar la creación de legislación en MPs en la calidad del agua, ya que, hasta el momento, sólo existe regulación de parámetros fisicoquímicos y microbiológicos (Ministerio de la Protección Social, 2007).

## **2. MATERIALES Y MÉTODOS**

La metodología presentada a continuación está basada en estudios previos realizados en 2018 por Oßmann, et al., Schymanski, et al., Mason, et al., y en 2019 por Zuccarello, et al. Se recopilaron las técnicas más apropiadas para ejecutarlas dentro de la presente propuesta del trabajo de investigación, adaptándolas al inventario de laboratorio de ingeniería ambiental de la Universidad de los Andes.

### **2.1 Recolección de datos**

Las muestras seleccionadas para el análisis de MPs son botellas de PET de un solo uso, bolsas de LDPE y botellas de vidrio de las cuatro marcas más reconocidas en Bogotá. Uno de los factores a analizar es si la cantidad de MPs detectados difiere según el lote en el que se envasó

el agua; por eso, se compran 2 muestras de agua por cada lote. Para garantizar que las muestras sean de lotes diferentes, las botellas se comprarán en supermercados de diferentes localidades de Bogotá y se revisará la información de fabricación y envase de cada una de ellas. En la Tabla 1, se presentan las 24 muestras de agua a analizar según su marca y sus respectivos materiales de envase, volumen, lote y código de muestra asignado.

**Tabla 1.** Asignación de código de muestras por muestra de agua embotellada. El código se construye a partir de la marca (A, B, C o D), el tipo de envase (P=PET, L=LDPE, V=Vidrio), el número de lote (1, 2) y el número de muestra del lote (1, 2).

Marca	Material de envase	Volumen (L)	Lote 1		Lote 2	
A	Botella PET	0.60	AP-1-1	AP-1-2	AP-2-1	AP-2-2
	Bolsa LDPE	0.35	AL-1-1	AL-1-2	AL-2-1	AL-2-2
B	Botella PET	0.60	BP-1-1	BP-1-2	BP-2-1	BP-2-2
	Bolsa LDPE	0.35	BL-1-1	BL-1-2	BL-2-1	BL-2-2
C	Botella Vidrio	0.60	CV-1-1	CV-1-2	CV-2-1	CV-2-2
D	Botella Vidrio	0.60	DV-1-1	DV-1-2	DV-2-1	DV-2-2

## 2.2 Materiales

Para el procesamiento de las muestras de MPs, se necesita pasar cada muestra tomada por un filtro de membrana de policarbonato PCTE de 45 mm de diámetro, con un tamaño de poro de 0.2  $\mu\text{m}$  para filtrar el rango completo de MPs (1  $\mu\text{m}$  – 5 mm). Se escoge este material de filtro debido a que no se degrada con la tinción del NR y su superficie hidrofílica previene que emita fluorescencia (Erni-Cassola et al., 2017; Mason et al., 2018). Adicionalmente, se utilizará un sistema de filtración al vacío hecho en vidrio del mismo diámetro del filtro.

La tinción de los MPs se realizará usando NR (9-dietilamino-5-benzo[a]-fenoxazinona) con una concentración de 1  $\mu\text{g}/\text{mL}$  usando metanol como base de disolución, ya que las propiedades translúcidas expuestas a esta solución permiten visualizar el filtro en modo oscuro y claro (Erni-Cassola et al., 2017). Para los métodos de análisis, se utilizará un microscopio de fluorescencia (Olympus IX71) con filtros de fluorescencia verde y roja para identificar los polímeros tinturados, pues es altamente recomendado su uso previo al uso de la espectroscopia (Scircle & Cizdziel, 2020). El ER que se utilizará es HORIBA Scientific

Xplora, con proyección láser entre 532 y 785 nm. Este espectroscopio tiene integrada la biblioteca Bio-Rad Sadtler (COD: 470100), la cual contiene hasta 1680 datos de espectros de polímeros básicos.

En el Anexo 1 se presenta la lista completa de los materiales utilizados en los procedimientos de toma de muestras con sus respectivas especificaciones técnicas según la etapa de la metodología. Adicionalmente, el presupuesto de los materiales faltantes según el inventario de la Universidad de los Andes y el precio de muestra para las técnicas de análisis y caracterización se presentan en el Anexo 3.

### **2.3 Protocolo de toma de muestras**

Primero, es necesario hacer un análisis de dureza de cada una de las muestras de agua, ya que cationes de calcio ( $\text{Ca}^{2+}$ ) y magnesio ( $\text{Mg}^{2+}$ ) pueden causar interferencia debido a su aporte de partículas minerales que pueden dificultar la cuantificación de MPs y aumentar el tiempo de análisis en las técnicas de caracterización (Oßmann et al., 2018). Ante una dureza alta, se debe tratar la muestra aplicando una cantidad de ácido etilendiaminotetraacético (EDTA) concentrada a 250 g/L, y dejarlo reaccionar por 15 minutos para que se disuelvan los cationes (Oßmann et al., 2018). Luego por cada litro de muestra, se adicionan 3 mL de dodecilsulfato sódico (SDS) a 100 g/L, ya que este detergente facilita la suspensión de MPs, haciéndolos flotar sobre la superficie del agua de muestreo (Oßmann et al., 2017).

A continuación, las muestras deben ser filtradas. Para cada botella de vidrio o plástico, se vierte la totalidad del volumen contenido en su envase sobre la tolva de 500 mL y se realiza una filtración utilizando un filtro de membrana y el sistema de filtración al vacío. Posteriormente, el filtro se remueve del soporte y se guarda en una caja Petri también fabricada en vidrio. El proceso de tinción sigue la metodología de Erni-Cassola, et al. (2017) y Scircle & Cizdziel (2020), los cuales proponen aplicar de 2 a 3 gotas de la solución de NR sobre el filtro en vez de aplicarse en la solución acuosa. Esto se debe a que la aplicación sobre el filtro directamente aumenta la frecuencia de contacto del NR con las partículas y las



superficies de los MPs (Shim, et al., 2016). Apenas se vierte la solución de tinción, la caja de Petri se tapa y se lleva con el filtro a un ambiente oscuro por 30 minutos con el fin de evitar una reacción de fotoblanqueo, es decir, la destrucción de partículas fluorescentes causada por la luz natural (Anger et al., 2018; Maes et al., 2017; Mason et al., 2018). A partir de este momento, es posible identificar los polímeros por medio del microscopio de fluorescencia, para luego llevarse a la determinación del tipo de MPs utilizando el ER. En las siguientes secciones se explica en detalle cada uno de los procedimientos. Se propone seguir el diagrama de flujo del Anexo 3 con el procedimiento general de muestreo.

#### **2.4 Protocolo de limpieza y filtración**

Para evitar que las muestras se contaminen con partículas de MPs suspendidos en el aire, la bata de laboratorio debe ser hecha 100 % de algodón. Además, tanto el procedimiento de filtración como de tinción, debe realizarse dentro de una campana de flujo laminar. Las botellas deben lavarse con agua desionizada y dejarse secar en la campana para que las muestras no se contaminen con partículas del exterior. De igual manera, los implementos que entren en contacto directo con los filtros tales como el soporte y contenedores de volumen, deben ser de vidrio para prevenir contaminación por desgaste del material, en caso de que sean de plástico (Mason et al., 2018; Oßmann et al., 2018; Schymanski et al., 2018; Zuccarello et al., 2019).

Antes y después de filtrar cada muestra, es de vital importancia cerciorarse de que los implementos de vidrio tales como cajas de Petri, goteros, beakers, tolvas, etc., no tengan desgastes visibles y se encuentren en perfectas condiciones para que no produzcan contaminación cruzada de partículas (Schymanski et al., 2018). Posteriormente, se esterilizan estos implementos sumergiéndolos en un baño ultrasónico por 15 minutos con dodecilsulfato sódico al 0.3 g/L, dada la efectividad del detergente en la remoción de contaminantes de vidrio (Oßmann et al., 2018). Luego, se lavan los implementos con etanol al 50 %. Después,

se sumergen en agua ultra-pura Milli-Q durante 30 minutos, para finalmente lavarlos con agua desionizada (Schymanski et al., 2018).

Sumado a lo anterior, la preparación de todas las soluciones utilizadas en los pasos de filtración y tintura, como NR, EDTA, SDS, agua desionizada, etc., debe ser filtrada también con los filtros de PCTE para evitar contaminación externa de partículas.

## **2.5 Blancos**

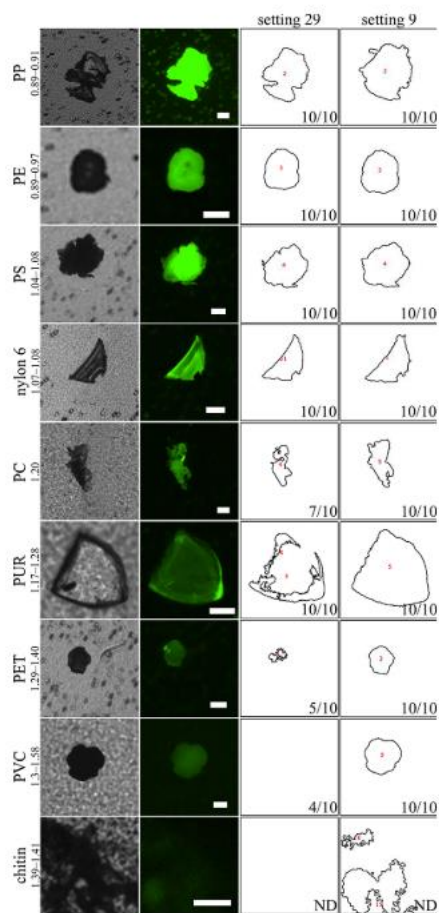
Si bien los 4 estudios que cuantifican agua embotellada utilizan blancos para comparar los resultados con una cantidad casi nula de MPs en el agua, el método con menor cantidad de partículas encontradas fue el de Schymanski, et al (2018) con un máximo de 42 p/L. Brevemente, el procedimiento consiste en alimentar el sistema de agua Milli-Q con agua desionizada, de manera que se utilice el agua de mejor calidad posible y con muy baja probabilidad de presencia de MPs. De esta forma, se recolecta 1 L de agua para refiltrarla 10 veces con un filtro de PCTE del mismo poro y diámetro utilizado en las muestras de agua embotellada. Estos filtros pasarán por el mismo procedimiento de microscopia de fluorescencia y Raman. Se hará una muestra de blanco por cada marca, para un total de 4 blancos.

## **2.6 Técnicas de análisis y caracterización**

### **2.6.1 Microscopia de fluorescencia**

El propósito de utilizar este tipo de microscopia es cuantificar visualmente los MPs. Durante la visualización de los filtros con la solución de NR ya aplicada, la exposición será de 30 ms al 30 % de fuerza de la luz LED, prefiriendo los filtros de fluorescencia verdes (emisión de excitación entre 450 y 500 nm), pues los polímeros sintéticos brillan con mayor intensidad en este rango de longitud de onda; igualmente, la intensidad de la señal de luz producida por el fondo del filtro es mucho menor (Erni-Cassola et al., 2017; Shim et al., 2016). El software de visualización más utilizado es ImageJ por sus funcionalidades de conteo e identificación de la morfología de los MPs (Erni-Cassola et al., 2017; Scircle & Cizdziel, 2020). Un ejemplo

de esta visualización se encuentra en la Figura 1, donde se evidencia que, a una intensidad de fluorescencia mayor, MPs de mayor hidrofobicidad como PP, polietileno (PE) y poliestireno (PS) fluorescen más que MPs de PET y policarbonato (PC). El PET tiene mayor dificultad de fluorescer, por lo que debe reforzarse su identificación por medio de la ER (Stanton et al., 2019).



**Figura 1.** Visualización de MPs bajo dos luminiscencias de microscopio de fluorescencia. Las opciones de fluorescencia 29 y 9 muestran la efectividad en la identificación del MP según su tipo de polímero. El autor de la investigación también incluye la visualización de otros polímeros, como el nylon, el poliuretano (PUR), el policloruro de vinilo (PVC por sus siglas en inglés) y quitina. Adaptado de (Erni-Cassola et al., 2017).

## 2.6.2 Espectroscopia Raman

Después de visualizar y cuantificar los MPs con el microscopio de fluorescencia, se utilizará la ER con el objetivo de caracterizar el tipo de MP según el espectro de luz emitido, proporcionando información sobre la vibración molecular ejercida que produce cada clase de

polímero (Araujo, et al., 2018). A pesar de ser una metodología de análisis costosa y demorada, pues el tiempo de visualización y determinación de la muestra puede tardar hasta 114 veces más que el FTIR, este tipo de espectroscopia es la más efectiva en procesos de detección de MPs con tamaño menor a 20  $\mu\text{m}$  (Araujo, et al., 2018; Hengstmann & Fischer, 2019; Käppler et al., 2016; Scircle & Cizdziel, 2020). Además, es un método no destructivo, al contrario de métodos como pirólisis o cromatografía de gases, y se puede realizar la lectura del tipo de plástico con el espectroscopio utilizando un tamaño muy pequeño de muestra de agua (Ribeiro-Claro, Nolasco, & Araújo, 2017). La Universidad cuenta con un equipo FTIR Bruker Alpha II para caracterizar elementos con tamaños mayores a 500  $\mu\text{m}$ , tales como fragmentos de MPs visibles en el mar; sin embargo, los rangos de tamaños esperados en las muestras de agua embotellada oscilan entre 5 y 100  $\mu\text{m}$ , razón por la cual no es posible validar la composición de los MPs con este equipo (Bruker, 2020).

Los análisis de identificación de MPs con el espectroscopio HORIBA se ejecutan usando un rango entre 100 y 3500  $\text{cm}^{-1}$ , y una exposición de 10 s (Erni-Cassola et al., 2017). Se usan láseres de 532 y 785 nm y un orificio confocal fijado a 300  $\mu\text{m}$  (Oßmann et al., 2018; Schymanski et al., 2018). Se recomienda reducir la lectura de partículas del filtro a áreas de 1  $\text{mm}^2$ , y subdividir las en 3 o 4 zonas para facilitar la identificación (Oßmann et al., 2018). Conjuntamente, por medio de un método binario sobre las imágenes que lee el espectroscopio, se puede determinar en aproximadamente 18 horas, la cantidad tamaño y morfología de los MPs detectados (Schymanski et al., 2018). En la Figura 2 y Figura 3, se pueden apreciar los espectros de los polímeros encontrados en muestreos de agua, donde se destacan las zonas del espectro que identifican con picos característicos de la longitud de onda del tipo de plástico analizado.

Es necesario utilizar un soporte en el visor del espectroscopio para obtener una superficie homogénea de la membrana durante la identificación de los MPs (Schymanski et al., 2018).

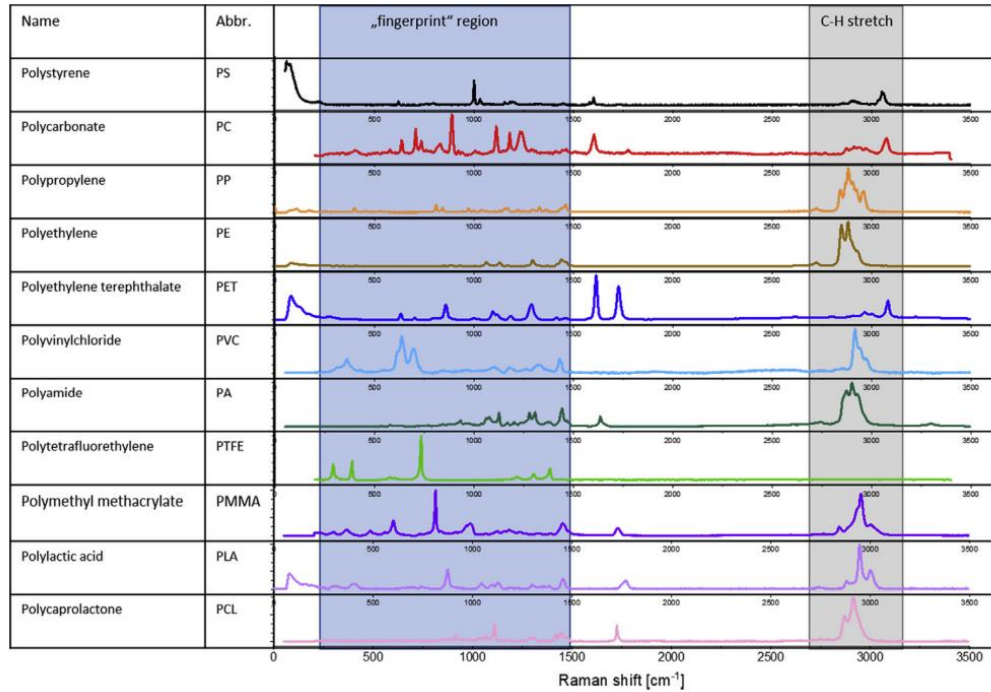
Esto proporcionará estabilidad en el filtro, de manera que se ubique siempre en la mitad del foco láser y sin ningún pliegue en la superficie.

Debido a que en estudios previos se han hallado 33 partículas en el filtro antes de filtrar las muestras de agua, se utilizará el espectroscopio en el protocolo de muestreo para realizar un análisis de pre-conteo de partículas en el filtro para descontar partículas contaminantes. De esta forma, al total de abundancia de partículas encontradas por muestra se le resta el número de partículas detectadas en el pre-conteo (Schymanski et al., 2018).

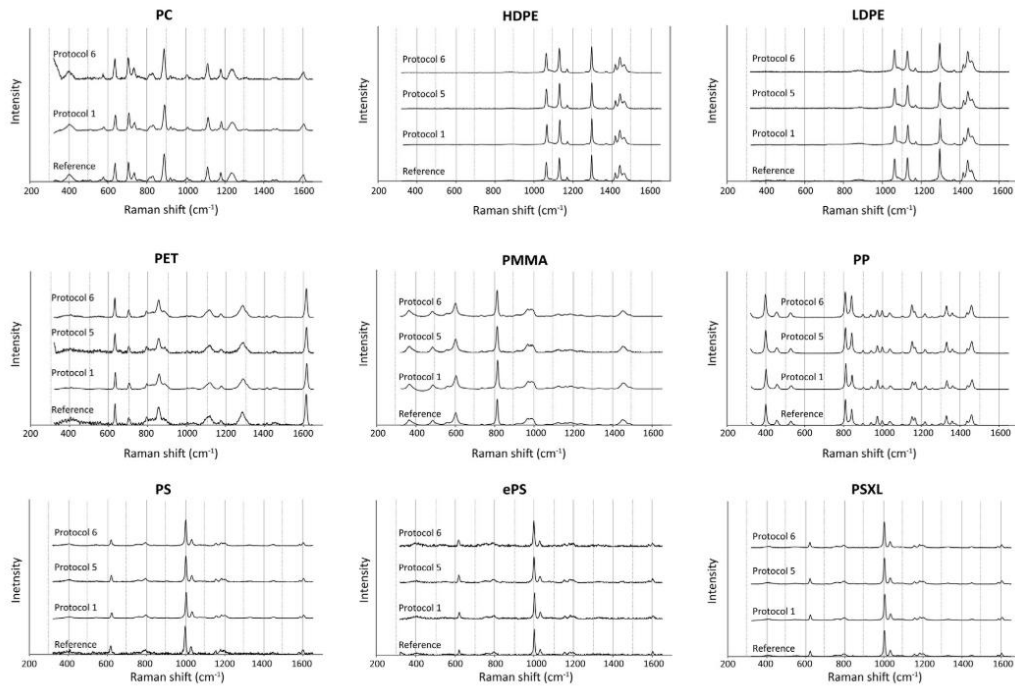
Finalmente, para el conteo y medición del tamaño de las partículas, existen dos alternativas de software para utilizarse en el análisis de imágenes obtenidas por la ER. La primera es ‘Single Particle Explorer’, la cual puede escanear hasta 5000 partículas por revisión de escáner y puede medir tamaños de hasta 1  $\mu\text{m}$  por medio de la resolución y escala del espectroscopio (Schymanski et al., 2018). También está el software ‘Galaxy Count’ implementado por Mason, et al. (2018), el cual utiliza el mismo principio de contrastar el fondo negro con las partículas fluorescentes (estrellas) para realizar el conteo. De acuerdo con la magnificación utilizada por la cámara que acompaña el equipo, 1 pixel equivale a 6.5  $\mu\text{m}$  (Mason et al., 2018).

## **2.7 Tratamiento estadístico**

Con el objetivo de analizar e interpretar los datos adecuadamente, se utilizará Microsoft Excel como herramienta para calcular mínimos, máximos, promedios y desviaciones estándar de los siguientes parámetros: tamaño de MPs ( $\mu\text{m}$ ), tipo de MP encontrado y concentración de partículas (p/L). Adicionalmente, dada la alta dispersión de los resultados de las investigaciones previas, es necesario calcular la varianza por procedimientos de ANOVA y el método de Tukey, procurando mantener intervalos de confianza de mínimo 95 % (Schymanski et al., 2018; Zuccarello et al., 2019).



**Figura 2.** Espectros de luz según el tipo de MP en ER, destacando los picos de longitud de onda para determinar cada plástico. La investigación del autor también incluye la identificación de otros polímeros, abreviados en sus siglas en inglés, como la poliamida (PA), el politetrafluoroetileno (PFTE), el polimetilmetacrilato (PMMA), ácido poliláctico (PLA) y la policaprolactona (PCL). Adaptado de (Anger et al., 2018)



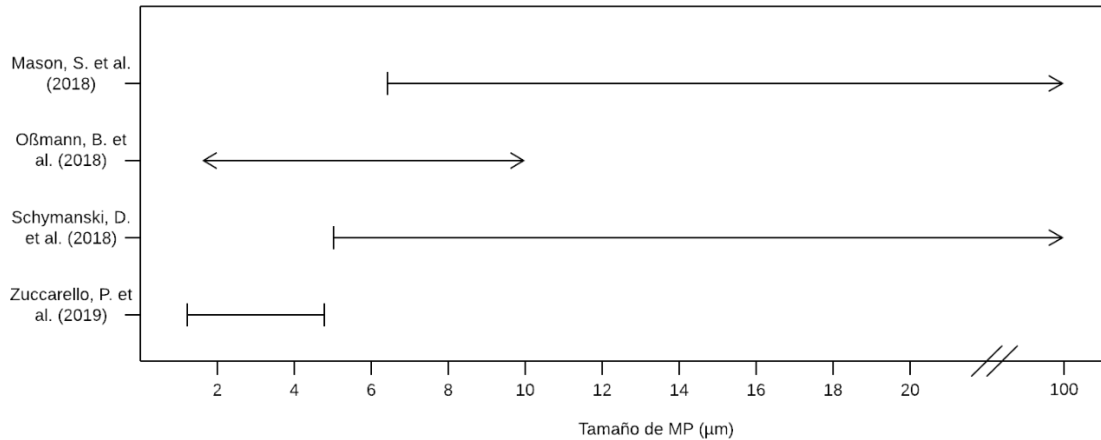
**Figura 3.** Espectros de luz según la intensidad de protocolos en ER. La investigación del autor también incluye la identificación de otros polímeros, abreviados en sus siglas en inglés, como poliestireno de alta densidad (HDPE), poliestireno expandido (ePS) y poliestireno reticulado (PSXL). Adaptado de (Dehaut et al., 2016).

### **3. RESULTADOS ESPERADOS Y DISCUSIÓN**

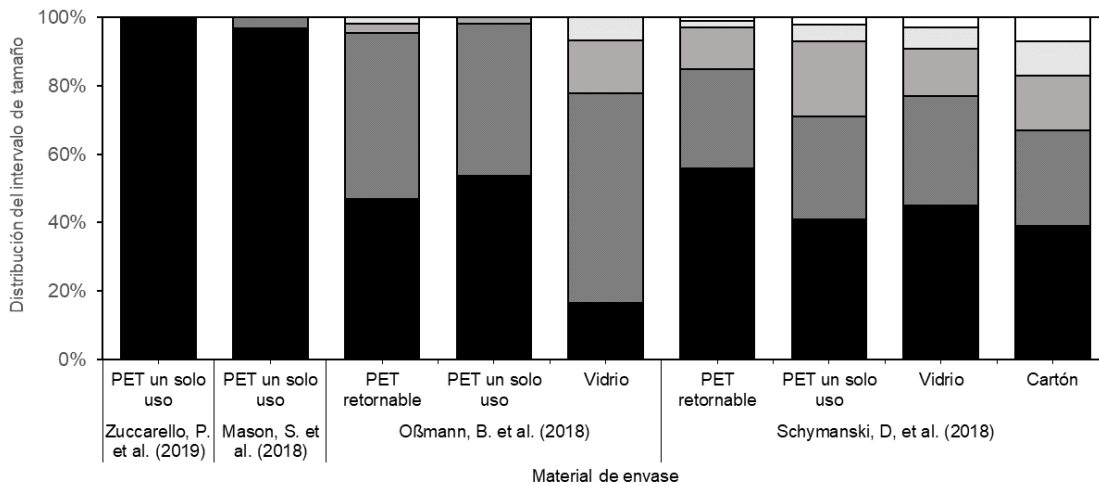
Los cuatro estudios anteriormente citados, usados como base para esta propuesta de trabajo de investigación, se utilizarán para comparar los resultados obtenidos en el estudio a realizar. Se interpretarán datos del tamaño de MPs y su distribución según el tipo de envase y número de lote. Sumado a esto, se compararán los resultados de las 28 muestras (24 de agua embotellada, 4 de blancos) en cuanto a la concentración de partículas, especificando también el tipo de MP y su morfología (fragmento, fibra o gránulo).

En la Figura 4 se puede apreciar la distribución de tamaños de partícula de MPs, de los estudios previamente citados (Mason et al., 2018; Oßmann et al., 2018; Schymanski et al., 2018; Zuccarello et al., 2019). En esta figura, Schymanski, et al. (2018) y Mason, et al. (2018) detectaron tamaños de partícula mayores de 100  $\mu\text{m}$ , mientras que se limitaron a cuantificar tamaños mínimos de 5 y 6.5  $\mu\text{m}$ , respectivamente. Los resultados presentados en esta figura también evidencian el rango común en el que se encuentran la mayoría de MPs, entre 6.5  $\mu\text{m}$  y 10  $\mu\text{m}$ , por lo que se espera que los resultados de este trabajo de investigación se sitúen entre estos límites.

La Figura 5 especifica el porcentaje de MPs que se encontraron en un rango específico según el tipo de envase que lo contenía (Mason et al., 2018; Oßmann et al., 2018; Schymanski et al., 2018; Zuccarello et al., 2019). Según esta figura, la mayoría de MPs se encuentra entre 1.28  $\mu\text{m}$  y 20  $\mu\text{m}$ , lo cual afirma la necesidad de utilizar un ER en vez de un FTIR (Käppler et al., 2016). En esta figura se evidencia que el rango de MPs no depende del tipo de envase, pues no se muestra una distribución homogénea con los rangos denominados.



**Figura 4.** Tamaño de partícula de MPs. La línea corta perpendicular a la orientación de la línea completa significa que el alcance de la medición fue hasta ese tamaño de partícula, mientras que la flecha significa que se detectaron tamaños de partícula mayores a ese valor.



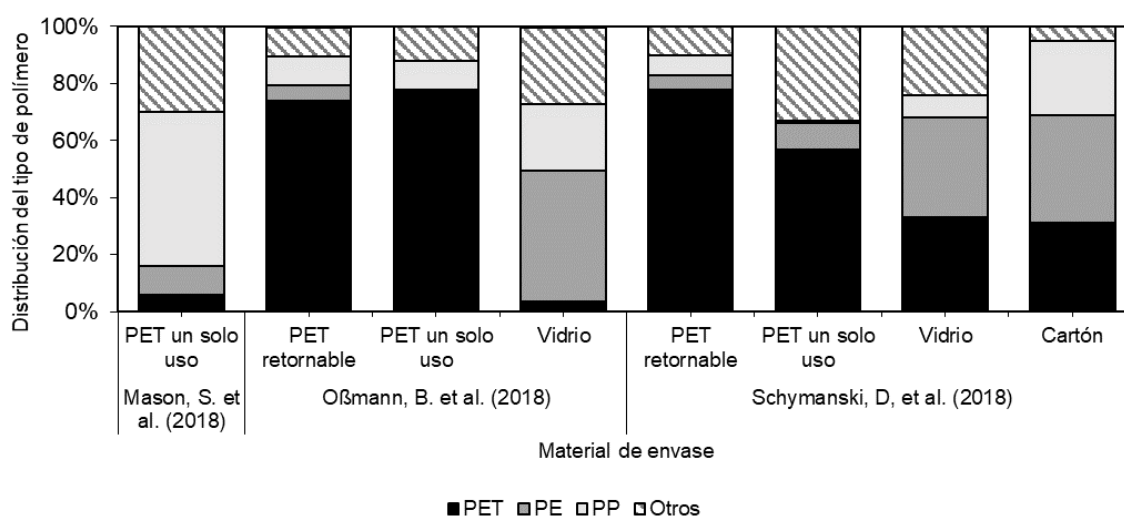
Rango de tamaño de MP (µm)				
	Zuccarello, P. et al.	Mason, S. et al.	Oßmann, B. et al.	Schymanski, D. et al.
Black	1.28 - 4.2	6.5 - 100	≤1.5	5 - 10
Dark Gray		≥100	1.5 - 5	10 - 20
Medium Gray			5 - 10	20 - 50
Light Gray			>10	50 - 100
White				≥100

**Figura 5.** Distribución de tamaño de partícula según el tipo de envase.

Por otro lado, en la Figura 6 se muestra la distribución del tipo de polímero de acuerdo con el tipo de envase. Es posible afirmar que la mayoría de MPs detectados en anteriores investigaciones son de PET, seguido por PE, PP, y otros tipos de polímeros como PS, pigmentos (Oßmann et al., 2018), poliamida (PA) (Schymanski et al., 2018), y nylon (Mason



et al., 2018). La investigación de Zuccarello, et al. (2019) no se incluye en esta figura, debido a los autores no caracterizaron el tipo de MPs. De esta figura se resalta que, en botellas de PET, la mayor cantidad de MPs detectados eran de este mismo material, lo cual sería causado posiblemente por un desgaste del material de envase (Mason et al., 2018; Oßmann et al., 2018). Sin embargo, los resultados entre los envases de vidrio presumirían que la contaminación puede provenir desde las instalaciones de envase y embotellamiento, pues los materiales de estos envases no contienen MPs (Schymanski et al., 2018).



**Figura 6.** Distribución del tipo de polímero de MP detectado según el tipo de envase.

La concentración promedio de partículas de MPs, se presenta en la Figura 7 y Figura 8. En dichas figuras se puede apreciar la alta desviación estándar que se obtiene durante la medición. De igual manera, la separación de los dos ejes también evidencia cuánto difieren los resultados obtenidos entre los autores. Las concentraciones de mayor magnitud estuvieron la mayoría en botellas de PET, por lo que se espera que los resultados del trabajo de investigación tengan un resultado parecido. No obstante, la desviación estándar de estos resultados refleja la variabilidad de detección en las muestras, ya sea por errores sistemáticos de muestreo, o por variaciones muy altas entre las marcas con un mismo tipo de envase (Mason et al., 2018; Oßmann et al., 2018; Schymanski et al., 2018; Zuccarello et al., 2019).

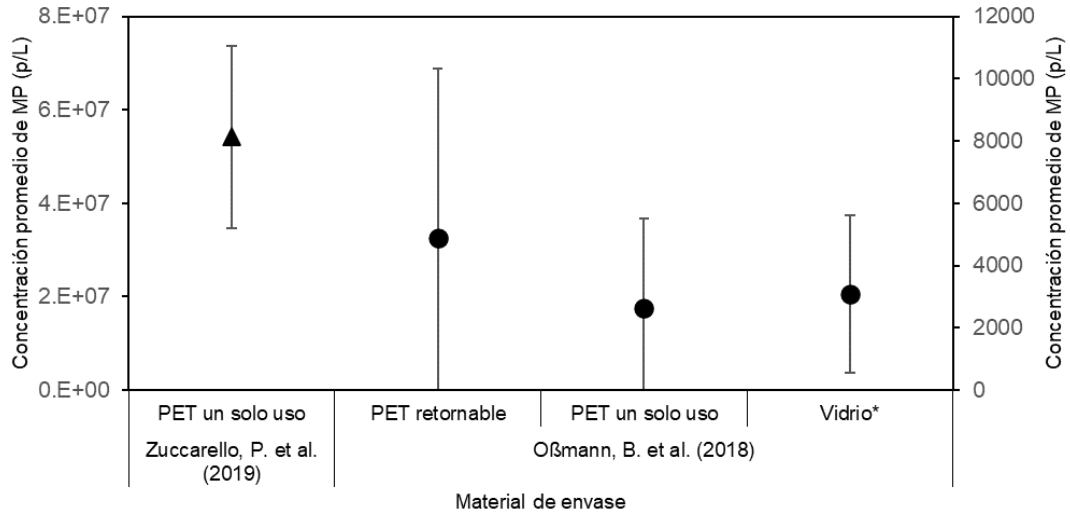
Para saber si estas muestras fueron representativas, se utilizará el método estadístico de muestreo aleatorio simple con o sin reemplazamiento (SRSWOR por sus siglas en inglés) (Valliant, et al., 2013) mencionado por Anger, et. al (2018) para analizar las muestras obtenidas en su estudio. La Ecuación (1) representa el tamaño de las muestras, o número de partículas requeridas ( $n$ ), donde  $P$  es el porcentaje estimado de MPs en la muestra,  $e$  es el margen de error (10 %-30 %),  $\sigma$  es el valor sigma para la distribución normal al 90 % (1.65) y  $N$  es el total de número de partículas encontradas en el filtro durante el análisis de imágenes (Anger et al., 2018). Suponiendo que la cantidad de partículas encontradas pertenecen a una muestra representativa y que, en total, la cantidad de partículas que se filtran son  $10^6$  (Anger et al., 2018), es posible calcular el porcentaje estimado de MPs en la muestra (MPs). Por ejemplo, para el caso de Mason, et al. (2018), con un error del 10 %, el 2.5 % del total de partículas en el filtro eran MPs. No obstante, el filtro con mayor cantidad de MPs fue de 10,351 partículas, por lo cual, la muestra sería representativa con errores entre el 20 y 30 %. Se espera que las muestras a calcular en el presente trabajo sean representativas con un valor de error máximo del 10 %.

**Tabla 2.** Porcentaje estimado de partículas de MPs detectadas a partir del número de partículas requeridas para generar una muestra representativa

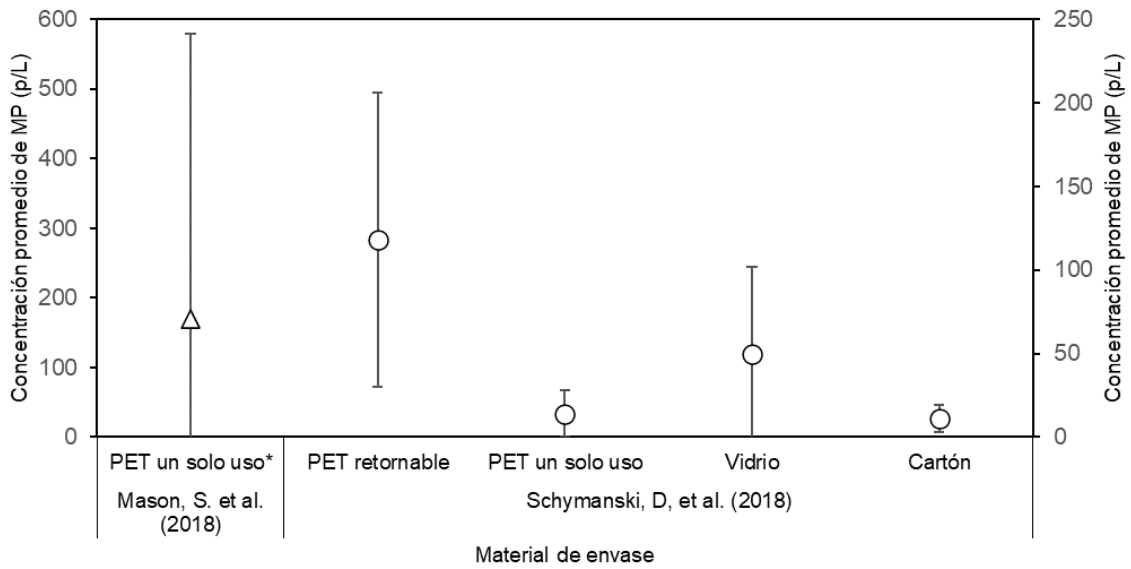
e	Mason, S. et al.	
10%	2.5%	25400
20%	0.65%	6500
30%	0.29%	2900

$$n \geq \frac{P(1 - P)}{\frac{e^2}{\sigma^2} + \frac{P(1 - P)}{N}} \quad (1)$$

**Ecuación 1.** Método estadístico SRSWOR. Adaptado de (Anger et al., 2018)



**Figura 7.** Concentración promedio de MPs (p/L) oscilando aproximadamente entre  $2 \times 10^3$  y  $6 \times 10^7$  p/L según el tipo de envase, cuantificada en trabajos de investigaciones previas en agua embotellada.



**Figura 8.** Concentración promedio de MPs (p/L) oscilando aproximadamente entre 10 y 300 p/L según el tipo de envase, cuantificada en trabajos de investigaciones previas en agua embotellada.

#### **4. CONCLUSIONES**

En esta propuesta de investigación, se buscará explicar una posible fuente de MPs en agua embotellada por medio de la caracterización del tipo de polímero encontrado. La utilización de dos diferentes tipos de material de envase plástico para las muestras, tales como PET y LDPE, permitirán determinar si las partículas identificadas coinciden con el material de fabricación del recipiente. De igual forma, la posible detección de MPs en los envases de vidrio demostraría que los MPs provienen de la fuente hídrica y/o de los procesos industriales que se llevan a cabo dentro de las instalaciones de embotellamiento de agua. Conjuntamente, el tamaño y las concentraciones de MPs que el estudio detecte explicaría si hay un déficit en la cadena de purificación y potabilización del agua embotellada en Bogotá, cuestionando los procedimientos utilizados actualmente.

No obstante, el estudio se limita al muestreo de envases de volúmenes intermedios, excluyendo la medición de MPs en recipientes donde hay mayor desgaste de la botella por tener mayor área superficial en contacto con el agua, como en botellones de PET de 6 litros. También está reducido a pocos lotes y pocas marcas de agua, minimizando la oportunidad de cuantificar la contaminación por MPs a nivel general en la ciudad bajo todo el comercio de agua tanto en las fuentes hídricas como en las instalaciones de embotellamiento. Otro factor limitante que se espera obtener en la investigación es la presencia de MPs en los blancos, puesto que la probable contaminación de partículas poliméricas en estas muestras no permitirá comparar adecuadamente las muestras de agua libres de MPs con aquellas contaminadas.

Con esta propuesta, se buscará detectar MPs en concentraciones entre 0 y 10,000 p/L, con variaciones entre el tipo de envase y el volumen muestreado. Estas partículas, probablemente en mayor proporción compuestas de PET, PP y PS, representan altas exposiciones para la salud pública de los habitantes de la ciudad, donde tampoco hay legislación que permita regular los niveles de ingestión de polímeros. Si bien los MPs que se esperan encontrar tienen

un tamaño que oscila entre los 5 y 10  $\mu\text{m}$ , se necesitan tinciones de alto costo y demanda de tiempo para analizar debidamente su composición y concentración en los envases de muestra.

Para estudios futuros, se recomienda ampliar el tipo de envases a retornables y con diferentes volúmenes. Esto incluiría envases en PC de mayores volúmenes, así como envases de PET reciclado. De igual forma, muestrear con agua mineral y agua con gas también puede representar variaciones en las mediciones del tipo de MPs encontrado en la botella, debido al efecto del dióxido de carbono en la botella (Schymanski et al., 2018). Igualmente, para minimizar el tiempo de cuantificación durante la microscopia de fluorescencia, se recomienda implementar el uso de programas como el MP-VAT, el cual cuenta automáticamente las partículas con cierto grado de fluorescencia según su tamaño y forma, con tasas de exactitud del 89 % (Prata et al., 2019). Asimismo, se recomienda utilizar un  $\mu$ -FTIR para agilizar y validar con un segundo equipo la identificación de MPs en las muestras que contengan partículas entre 100 y 500  $\mu\text{m}$ . Por otro lado, para confirmar que la contaminación de MPs es ubicua y que no depende exclusivamente del material de envase, se recomienda muestrear botellas de vidrio o de cartón de marcas internacionales, pues el agua contenida proviene de fuentes hídricas del país correspondiente de fabricación.

## 5. REFERENCIAS

- Acosta-Coley, I., Duran-Izquierdo, M., Rodríguez-Cavallo, E., Mercado-Camargo, J., Mendez-Cuadro, D., & Olivero-Verbel, J. (2019). Quantification of microplastics along the Caribbean Coastline of Colombia: Pollution profile and biological effects on *Caenorhabditis elegans*. *Marine Pollution Bulletin*, *146*(July), 574–583. <https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2019.06.084>
- Anger, P. M., von der Esch, E., Baumann, T., Elsner, M., Niessner, R., & Ivleva, N. P. (2018, December 1). Raman microspectroscopy as a tool for microplastic particle analysis. *TrAC - Trends in Analytical Chemistry*, Vol. 109, pp. 214–226. <https://doi.org/10.1016/j.trac.2018.10.010>
- Araujo, C. F., Nolasco, M. M., Ribeiro, A. M. P., & Ribeiro-Claro, P. J. A. (2018a). Identification of microplastics using Raman spectroscopy: Latest developments and future prospects. *Water Research*, *142*, 426–440. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2018.05.060>
- Araujo, C. F., Nolasco, M. M., Ribeiro, A. M. P., & Ribeiro-Claro, P. J. A. (2018b). Identification of microplastics using Raman spectroscopy: Latest developments and future prospects. *Water Research*, *142*, 426–440. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.watres.2018.05.060>
- Ball, H., Cross, R., Grove, E., Horton, A., Johnson, A., Jurgens, M., ... Svendsen, C. (2019). *Sink to river - river to tap. A review of potential risks from nanoparticles and microplastics: period covered 2018/2019*. Retrieved from [https://ukwir.org/view/\\$NvDnwfml](https://ukwir.org/view/$NvDnwfml)
- Bruker. (2020). *Compact FT-IR Spectrometer \_ ALPHA II \_ Bruker*. Retrieved from <https://www.bruker.com/products/infrared-near-infrared-and-raman-spectroscopy/ft-ir-routine-spectrometers/compact-ftir-alpha-ii.html>
- Cai, L., Wang, J., Peng, J., Tan, Z., Zhan, Z., Tan, X., & Chen, Q. (2017). Characteristic of microplastics in the atmospheric fallout from Dongguan city, China: preliminary research and first evidence. *Environmental Science and Pollution Research*, *24*(32), 24928–24935. <https://doi.org/10.1007/s11356-017-0116-x>
- Calderon, E. A., Hansen, P., Rodríguez, A., Blettler, M. C. M., Syberg, K., & Khan, F. R. (2019). Microplastics in the Digestive Tracts of Four Fish Species from the Ciénaga Grande de Santa Marta Estuary in Colombia. *Water, Air, and Soil Pollution*, *230*(11). <https://doi.org/10.1007/s11270-019-4313-8>
- Carpenter, E. J., & Smith, K. L. (1972). Plastics on the Sargasso sea surface. *Science*, *175*(4027), 1240–1241. <https://doi.org/10.1126/science.175.4027.1240>
- Cox, K. D., Covernton, G. A., Davies, H. L., Dower, J. F., Juanes, F., & Dudas, S. E. (2019). Human Consumption of Microplastics. *Environmental Science and Technology*, *53*(12), 7068–7074. <https://doi.org/10.1021/acs.est.9b01517>
- Erni-Cassola, G., Gibson, M. I., Thompson, R. C., & Christie-Oleza, J. A. (2017). Lost, but Found with Nile Red: A Novel Method for Detecting and Quantifying Small

- Microplastics (1 mm to 20  $\mu\text{m}$ ) in Environmental Samples. *Environmental Science and Technology*, 51(23), 13641–13648. <https://doi.org/10.1021/acs.est.7b04512>
- GESAMP. (2015). Sources, fate and effects of MP in the marine environment. *Journal Series GESAMP Reports and Studies*, 90, 98. Retrieved from [www.imo.org](http://www.imo.org)
- Geyer, R., Jambeck, J. R., & Law, K. L. (2017). Production, use, and fate of all plastics ever made. *Science Advances*, 3(7), 25–29. <https://doi.org/10.1126/sciadv.1700782>
- Jiang, J. Q. (2018). Occurrence of microplastics and its pollution in the environment: A review. *Sustainable Production and Consumption*, 13(November), 16–23. <https://doi.org/10.1016/j.spc.2017.11.003>
- Käppler, A., Fischer, D., Oberbeckmann, S., Schernewski, G., Labrenz, M., Eichhorn, K. J., & Voit, B. (2016). Analysis of environmental microplastics by vibrational microspectroscopy: FTIR, Raman or both? *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 408(29), 8377–8391. <https://doi.org/10.1007/s00216-016-9956-3>
- Karbalaei, S., Hanachi, P., TR, W., & Cole, M. (2018). Occurrence, sources, human health impacts and mitigation of microplastic pollution. *Environmental Science and Pollution Research International TA - TT -*, 25(36), 36046–36063. <https://doi.org/10.1007/s11356-018-3508-7> LK - <https://univdelosandes.on.worldcat.org/oclc/7900851853>
- Koelmans, A. A., Mohamed Nor, N. H., Hermesen, E., Kooi, M., Mintenig, S. M., & De France, J. (2019). Microplastics in freshwaters and drinking water: Critical review and assessment of data quality. *Water Research*, Vol. 155, pp. 410–422. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2019.02.054>
- Kosuth, M., Mason, S. A., & Wattenberg, E. V. (2018). Anthropogenic contamination of tap water, beer, and sea salt. *PLoS ONE*, 13(4), 1–19. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0194970>
- Kutralam-Muniasamy, G., Pérez-Guevara, F., Elizalde-Martínez, I., & Shruti, V. C. (2020). Branded milks – Are they immune from microplastics contamination? *Science of the Total Environment*, 714. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.136823>
- Lenz, R., Enders, K., Stedmon, C. A., MacKenzie, D. M. A., & Nielsen, T. G. (2015). A critical assessment of visual identification of marine microplastic using Raman spectroscopy for analysis improvement. *Marine Pollution Bulletin*, 100(1), 82–91. <https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2015.09.026>
- Liebezeit, G., & Liebezeit, E. (2013). Non-pollen particulates in honey and sugar. *Food Additives and Contaminants - Part A Chemistry, Analysis, Control, Exposure and Risk Assessment*, 30(12), 2136–2140. <https://doi.org/10.1080/19440049.2013.843025>
- Liebezeit, G., & Liebezeit, E. (2014). Synthetic particles as contaminants in German beers. *Food Additives and Contaminants - Part A Chemistry, Analysis, Control, Exposure and Risk Assessment*, 31(9), 1574–1578. <https://doi.org/10.1080/19440049.2014.945099>
- Maes, T., Jessop, R., Wellner, N., Haupt, K., & Mayes, A. G. (2017). A rapid-screening

- approach to detect and quantify microplastics based on fluorescent tagging with Nile Red. *Scientific Reports*, 7. <https://doi.org/10.1038/srep44501>
- Mason, S. A., Welch, V. G., & Neratko, J. (2018). Synthetic Polymer Contamination in Bottled Water. *Frontiers in Chemistry*, 6, 407. <https://doi.org/10.3389/fchem.2018.00407>
- Oßmann, B. E., Sarau, G., Holtmannspötter, H., Pischetsrieder, M., Christiansen, S. H., & Dicke, W. (2018). Small-sized microplastics and pigmented particles in bottled mineral water. *Water Research*, 141, 307–316. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.watres.2018.05.027>
- Oßmann, B. E., Sarau, G., Schmitt, S. W., Holtmannspötter, H., Christiansen, S. H., & Dicke, W. (2017). Development of an optimal filter substrate for the identification of small microplastic particles in food by micro-Raman spectroscopy. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 409(16), 4099–4109. <https://doi.org/10.1007/s00216-017-0358-y>
- Peixoto, D., Pinheiro, C., Amorim, J., Oliva-Teles, L., Guilhermino, L., & Vieira, M. N. (2019). Microplastic pollution in commercial salt for human consumption: A review. *Estuarine, Coastal and Shelf Science*, 219(January 2018), 161–168. <https://doi.org/10.1016/j.ecss.2019.02.018>
- Pivokonsky, M., Cermakova, L., Novotna, K., Peer, P., Cajthaml, T., & Janda, V. (2018). Occurrence of microplastics in raw and treated drinking water. *Science of the Total Environment*, 643, 1644–1651. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2018.08.102>
- Prata, J. C., Reis, V., Matos, J. T. V., da Costa, J. P., Duarte, A. C., & Rocha-Santos, T. (2019). A new approach for routine quantification of microplastics using Nile Red and automated software (MP-VAT). *Science of the Total Environment*, 690, 1277–1283. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2019.07.060>
- Ribeiro-Claro, P., Nolasco, M. M., & Araújo, C. (2017). Characterization of Microplastics by Raman Spectroscopy. *Comprehensive Analytical Chemistry*, 75, 119–151. <https://doi.org/10.1016/bs.coac.2016.10.001>
- Schymanski, D., Goldbeck, C., Humpf, H.-U., & Fürst, P. (2018). Analysis of microplastics in water by micro-Raman spectroscopy: Release of plastic particles from different packaging into mineral water. *Water Research*, 129, 154–162. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.watres.2017.11.011>
- Scircle, A., & Cizdziel, J. V. (2020). Detecting and Quantifying Microplastics in Bottled Water using Fluorescence Microscopy: A New Experiment for Instrumental Analysis and Environmental Chemistry Courses. *Journal of Chemical Education*, 97(1), 234–238. <https://doi.org/10.1021/acs.jchemed.9b00593>
- Sharma, S., & Chatterjee, S. (2017). Microplastic pollution, a threat to marine ecosystem and human health: a short review. *Environmental Science and Pollution Research*, 24(27), 21530–21547. <https://doi.org/10.1007/s11356-017-9910-8>
- Shim, W. J., Song, Y. K., Hong, S. H., & Jang, M. (2016). Identification and quantification



- of microplastics using Nile Red staining. *Marine Pollution Bulletin*, 113(1–2), 469–476. <https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2016.10.049>
- Shruti, V. C., Pérez-Guevara, F., & Kutralam-Muniasamy, G. (2020). Metro station free drinking water fountain- A potential “microplastics hotspot” for human consumption. *Environmental Pollution*, 261. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2020.114227>
- Smith, M., Love, D. C., Rochman, C. M., & Neff, R. A. (2018). Microplastics in Seafood and the Implications for Human Health. *Current Environmental Health Reports*, 5(3), 375–386. <https://doi.org/10.1007/s40572-018-0206-z>
- Social, M. de la P. *Decreto 1575 de 2007*. , (2007).
- Stanton, T., Johnson, M., Nathanail, P., Gomes, R. L., Needham, T., & Burson, A. (2019). Exploring the Efficacy of Nile Red in Microplastic Quantification: A Costaining Approach. *Environmental Science and Technology Letters*, 6(10), 606–611. <https://doi.org/10.1021/acs.estlett.9b00499>
- Trischler, H. (2016). The Anthropocene: A Challenge for the History of Science, Technology, and the Environment. *NTM International Journal of History and Ethics of Natural Sciences, Technology and Medicine*, 24(3), 309–335. <https://doi.org/10.1007/s00048-016-0146-3>
- UN Environment. (2018). Mapping of global plastics value chain and plastic losses to the environment (with a particular focus on marine environment). *United Nations Environment*, 96. Retrieved from [https://gefmarineplastics.org/files/2018 Mapping of global plastics value chain and hotspots - final version r181023.pdf](https://gefmarineplastics.org/files/2018%20Mapping%20of%20global%20plastics%20value%20chain%20and%20hotspots%20-%20final%20version%20r181023.pdf)
- Valliant, R., Dever, J. A., & Kreuter, F. (2013). Practical tools for designing and weighting survey samples. In *Practical Tools for Designing and Weighting Survey Samples*. <https://doi.org/10.1007/978-1-4614-6449-5>
- Wagner, M., & Lambert, S. (2018). *Freshwater Microplastics - The Handbook of Environmental Chemistry* 58. 302. <https://doi.org/10.1007/978-3-319-61615-5>
- Zuccarello, P., Ferrante, M., Cristaldi, A., Copat, C., Grasso, A., Sangregorio, D., ... Conti, G. O. (2019). Exposure to microplastics (<10 µm) associated to plastic bottles mineral water consumption: The first quantitative study. *Water Research*, 157, 365–371. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.watres.2019.03.091>

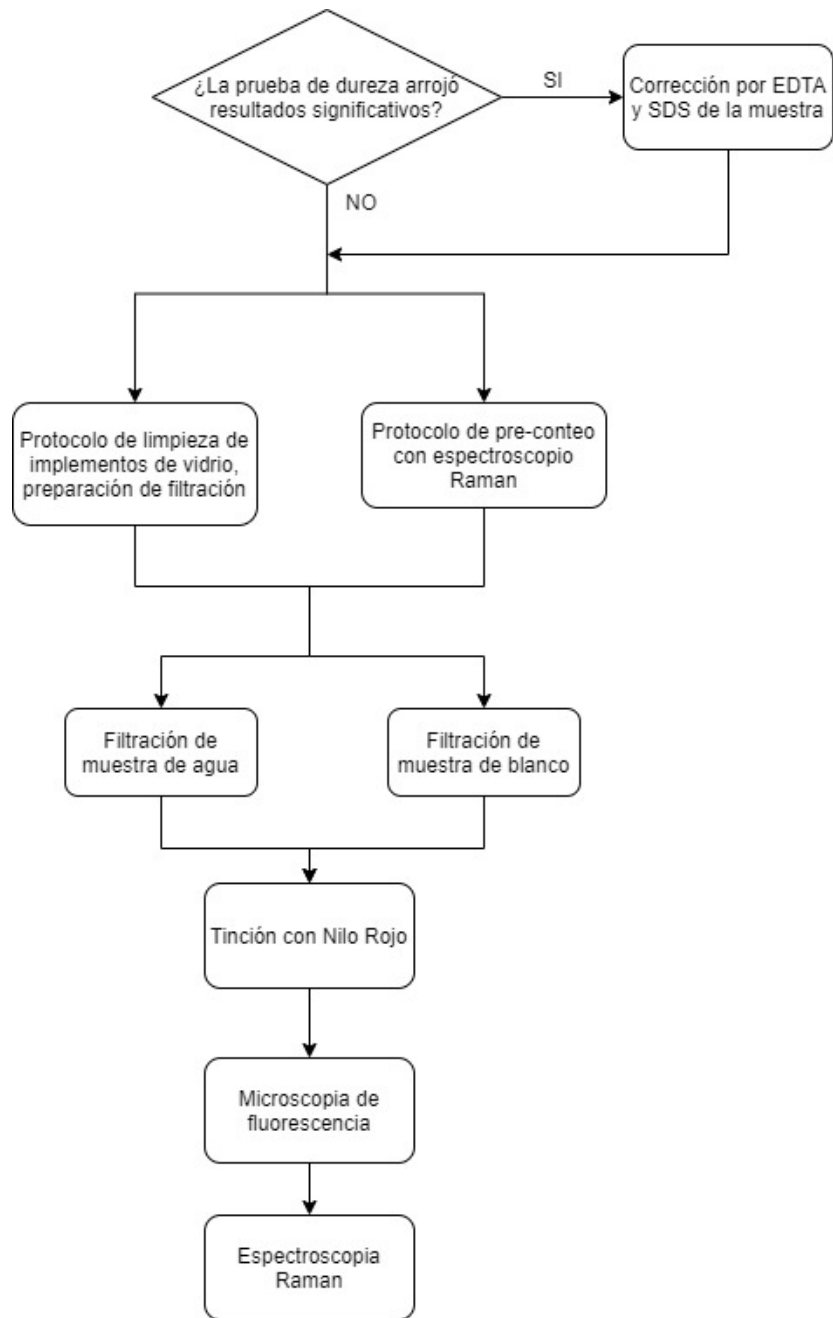
## 6. ANEXOS

**Anexo 1.** Especificaciones técnicas de los materiales a utilizar, según la etapa de la metodología de muestreo.

<b>Etapa</b>	<b>Material</b>	<b>Especificación técnica</b>
Filtración	Filtro de membrana PCTE Sterlitech ®	<ul style="list-style-type: none"> <li>• diámetro: 45 mm</li> <li>• color: negro</li> <li>• tamaño del poro: 0.2 µm</li> <li>• espesor: 25 mm</li> <li>• densidad del poro: 500 mill/cm<sup>2</sup></li> <li>• flujo de agua (10 PSI): 10 mL/min/cm<sup>2</sup></li> </ul>
	Soporte de filtración al vacío en vidrio KG-47 (MsScientific ®)	<ul style="list-style-type: none"> <li>• diámetro de filtración: 45 mm</li> <li>• volumen del embudo: 300 mL</li> <li>• área de filtración: 9.6 cm<sup>2</sup></li> <li>• volumen de tolva de filtración: 500 mL</li> </ul>
	Ácido etilendiaminotetraacético (EDTA)	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Concentración: 100 g/L</li> </ul>
	Dodecilsulfato sódico (SDS)	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Concentración: 250 g/L</li> </ul>
Técnicas de visualización y caracterización	Espectroscopio Raman HORIBA ®	<ul style="list-style-type: none"> <li>• modelo: XPLORA</li> <li>• serie: X1041210</li> </ul>
	Microscopio de fluorescencia Olympus ®	<ul style="list-style-type: none"> <li>• referencia: IX71</li> <li>• objetivos disponibles: 20x/0.5, 20x/0.45, 10x/0.4, 40x/1.30, 60x/1.4</li> <li>• filtros de fluorescencia disponibles: U-N31001 FITC, U-N31000v2 DAPI, U-N49003 ET YPF, U-N49005 ET R/DsRED</li> </ul>
Protocolo	Campana de flujo laminar Labconco ®	<ul style="list-style-type: none"> <li>• modelo: Purifier Delta 3620404</li> <li>• filtro: HEPA</li> <li>• lámpara UV</li> </ul>
	Sistema de purificación de agua Milli-Q ® Reference	<ul style="list-style-type: none"> <li>• referencia: C76925</li> </ul>

**Anexo 2.** Presupuesto del trabajo de investigación según precios cotizados en instalaciones de la Universidad de los Andes. La tasa representativa del mercado (TRM) del cálculo del costo en pesos colombianos (COP) corresponde al día 15 de junio de 2020. Los ítems que contienen N.A. fueron cotizados directamente en COP. (a) El costo del muestreo del espectroscopio Raman tienen un descuento del 10 % sobre el valor de la muestra.

<b>Material / Muestra</b>	<b>Cantidad</b>	<b>Costo unitario (USD)</b>	<b>Costo unitario (COP)</b>	<b>Costo después de importación e IVA</b>	<b>Costo total (COP)</b>
Filtro de membrana PCTE Sterlitech ® (caja x100 und.)	1	\$ 127.77	\$ 480,178	\$ 720,268	\$ 720,268
Muestra de microscopia de fluorescencia	28	N.A.	\$ 70,300	N.A.	\$ 1'968,400
Muestra de espectroscopio Raman	28	N.A.	\$ 171,000 <sup>a</sup>	N.A.	\$ 4'788,000
				<b>TOTAL</b>	<b>\$ 7'476,700</b>



**Anexo 3.** Diagrama de flujo de la metodología del trabajo de investigación