

TECNOLÓGICO NACIONAL DE MÉXICO
INSTITUTO TECNOLÓGICO DE AGUASCALIENTES



TECNOLÓGICO
NACIONAL DE MÉXICO®

**Ciencia y
Tecnología**

Secretaría de Ciencia, Humanidades,
Tecnología e Innovación



Instituto **Tecnológico**®
de Aguascalientes

DOCTORADO EN CIENCIAS DE LA INGENIERÍA

**Cuantificación de microplásticos en
muestras líquidas**

Tesis de Doctorado
Para obtener el título de:
Doctor en Ciencias de la Ingeniería

Presenta

M.C. María Teresa López Martínez

Directora

Dra. Ma. Rosario González Mota

Co-Director

Dr. J. Ascensión Guerrero Viramontes

Asesores

Dr. Juan José Soto Bernal

Dra. Virginia Hernández Montoya

Dr. Claudio Frausto Reyes

Aguascalientes, Ags., México
Mayo 2025





Aguascalientes, Ags., 26/mayo/2025

No. De Oficio: 0224/2025

Asunto: **Autorización de Tesis de Grado Para su Impresión**

M.C. MARÍA TERESA LÓPEZ MARTÍNEZ
PRESENTE

Los abajo firmantes, Miembros del Jurado para Examen de Grado de Doctorado, hacemos **CONSTAR** que, habiendo revisado el Trabajo de Tesis desarrollado por Usted, bajo el título: **"CUANTIFICACIÓN DE MICROPLÁSTICOS EN MUESTRAS LÍQUIDAS"** hemos dictaminado que éste es de aceptarse, por lo que se autoriza su impresión.

ATENTAMENTE

Excelencia en Educación Tecnológica®
Ingenio, Cultura y Saber, que conducen a la Excelencia®

PRESIDENTE

DRA. MA. ROSARIO GONZÁLEZ MOTA

SECRETARIO

DR. J. ASCENCIÓN GUERRERO VIRAMONTES

VOCAL

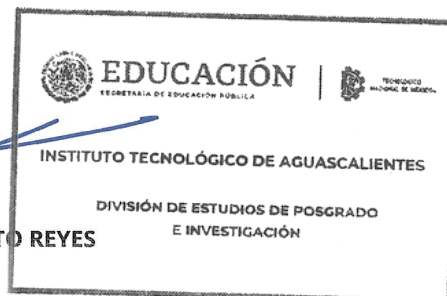
DR. JUAN JOSÉ SOTO BERNAL

VOCAL

DRA. VIRGINIA HERNÁNDEZ MONTOYA

VOCAL

DR. CLAUDIO FRAUSTO REYES



2025
Año de
La Mujer
Indígena

Av. Adolfo López Mateos #1801. Fracc. Bona Gens
C.P. 20256 Aguascalientes, Ags. Tel. 449 910 5002 ext. 127
e-mail: jefatura.depi@aguascalientes.tecnm.mx
tecnm.mx | www.aguascalientes.tecnm.mx





Instituto Tecnológico de Aguascalientes
División de Estudios de Posgrado e Investigación

Aguascalientes, Ags., 26/mayo/2025
Asunto: Autorización de uso de derechos

LÓPEZ MARTÍNEZ MARÍA TERESA, mayor de edad, con domicilio ubicado en **síndicos 214, Municipio Libre, 20199, Aguascalientes, Aguascalientes** en mi calidad de titular y autor de la tesis denominada **"CUANTIFICACIÓN DE MICROPLÁSTICOS EN MUESTRAS LÍQUIDAS"** quien para todos los fines del presente documento se denominará **EL AUTOR Y/O TITULAR**, suscribo el presente documento de autorización de uso de derechos patrimoniales de autor a favor del Tecnológico Nacional de México/Instituto Tecnológico de Aguascalientes el cual se registrará por las cláusulas siguientes:

PRIMERA - AUTORIZACIÓN: EL AUTOR Y/O TITULAR, mediante el presente documento autoriza la utilización de los derechos patrimoniales de autor al Tecnológico Nacional de México/Instituto Tecnológico de Aguascalientes, de la tesis denominada **"CUANTIFICACIÓN DE MICROPLÁSTICOS EN MUESTRAS LÍQUIDAS"**, a través del Repositorio Institucional del Tecnológico Nacional de México (en lo sucesivo TecNM) y en el Repositorio Nacional, que puede ser consultado en la liga electrónica: (www.repositorionacionalcti.mx/).

SEGUNDA - OBJETO: Por medio del presente escrito, **EL AUTOR Y/O TITULAR** autoriza al Tecnológico Nacional de México/Instituto Tecnológico de Aguascalientes, a través del Repositorio Institucional del TecNM y en el Repositorio Nacional para que de conformidad con la Ley Federal del Derecho de Autor y la Ley de la Propiedad Industrial, use los derechos del documento antes referido, con fines exclusivamente académicos.

TERCERA - TERRITORIO: Los derechos aquí autorizados se dan sin limitación geográfica o territorial alguna.

CUARTA - ALCANCE: La presente autorización se da tanto para formato o soporte material, y se extiende a la utilización en medio óptico, magnético, electrónico, en red, mensajes de datos o similar conocido o por conocer, del ejemplar o número respectivo de la publicación.

QUINTA - EXCLUSIVIDAD: La autorización de uso aquí establecida no implica exclusividad en favor del Tecnológico Nacional de México/Instituto Tecnológico de Aguascalientes. Por lo tanto, **EL AUTOR Y/O TITULAR** en su carácter de autor de la obra objeto del presente documento se reserva el derecho de publicar directamente, u otorgar a cualquier tercero, autorizaciones de uso similares o en los mismos términos aquí acordados.



2025
Año de
La Mujer
Indígena

Av. Adolfo López Mateos #1801, Fracc. Bona Gens
C.P. 20256 Aguascalientes, Ags. Tel. 449 910 5002 ext. 127
e-mail: jefatura.depi@aguascalientes.tecnm.mx
tecnm.mx | www.aguascalientes.tecnm.mx





SEXTA - DERECHOS MORALES (Créditos y mención): La Autorización de los derechos antes mencionados no implica la cesión de los derechos morales sobre los mismos por cuanto en conformidad con lo establecido en los artículos 18, 19, 20, 21, 22 y 23 de la Ley Federal de Derechos de Autor, dada la cuenta que estos derechos son inalienables, imprescriptibles, irrenunciables e inembargables. Por lo tanto, los mencionados derechos seguirán radicados en cabeza de EL AUTOR Y/O TITULAR, y siempre deberá mencionarse su nombre cuando se utilice la obra.

SÉPTIMA - AUTORÍA: EL AUTOR Y/O TITULAR, declara y ratifica que el material objeto de la presente fue realizada por él o por ella sin violar o usurpar derechos de Propiedad Intelectual de terceros.

ATENTAMENTE

Excelencia en Educación Tecnológica®
Ingenio, Cultura y Saber, que conducen a la Excelencia

Vo.Bo.

LÓPEZ MARTÍNEZ MARÍA TERESA
AUTOR DE LA TESIS

DRA. MA. ROSARIO GONZÁLEZ MOTA
DIRECTOR DE LA TESIS

ccp. Archivo



2025
Año de
La Mujer
Indígena

Av. Adolfo López Mateos #1801. Fracc. Bona Gens
C.P. 20256 Aguascalientes, Ags. Tel. 449 910 5002 ext. 127
e-mail: jefatura.depi@aguascalientes.tecnm.mx
tecnm.mx | www.aguascalientes.tecnm.mx





Instituto Tecnológico de Aguascalientes
División de Estudios de Posgrado e Investigación

Aguascalientes, Ags., 27/mayo/2025
Asunto: Oficio de originalidad

CLAUSTRO DOCTORAL
DOCTORADO EN CIENCIAS DE LA INGENIERÍA
PRESENTE

El director de tesis de **MARÍA TERESA LÓPEZ MARTÍNEZ** estudiante del **Doctorado en Ciencias de la Ingeniería** con número de control R20150501 hace constar que, después de haber realizado la revisión del informe de originalidad generado con la herramienta Turnitin, el trabajo **"CUANTIFICACIÓN DE MICROPLASTICOS EN MUESTRAS LÍQUIDAS"** es original conforme a los criterios establecidos. El porcentaje de similitud es de 08 % y se adjunta resumen del reporte.

ATENTAMENTE

Excelencia en Educación Tecnológica®
Ingenio, Cultura y Saber, que conducen a la Excelencia®

DRA. MA. ROSARIO GONZÁLEZ MOTA
DIRECTOR DE TESIS

Vo.Bo.

DR. J. ASCENSIÓN GUERRERO VIRAMONTES
COORDINADOR DEL DOCTORADO EN
CIENCIAS DE LA INGENIERÍA

ccp. Archivo



2025
Año de
La Mujer
Indígena

Av. Adolfo López Mateos #1801. Fracc. Bona Gens
C.P. 20256 Aguascalientes, Ags. Tel. 449 910 5002 ext. 127
e-mail: jefatura.depi@aguascalientes.tecnm.mx
tecnm.mx | www.aguascalientes.tecnm.mx





Agradecimientos

Agradezco al TecNM / Instituto Tecnológico de Aguascalientes y a la Secretaría de Ciencia, Humanidades, Tecnología e Innovación, Secihti a través del apoyo 759680 por todo el soporte institucional brindado para la realización y conclusión de este proyecto doctoral.

A los asesores, sinodales y todas aquellas personas que de manera directa o indirecta participaron en la realización de esta investigación.

Índice

Agradecimientos	i
Índice	ii
Índice de Figuras	iv
Índice de Tablas	vi
Nomenclatura	vii
Capítulo I. Introduccion	1
1.1 Objetivos	2
1.1.1 General	2
1.1.2 Específicos	2
Capítulo II. Marco Teórico.....	4
2.1 Microplásticos	4
2.1.1 Clasificación.....	4
2.1.2 Impacto ambiental.....	5
2.1.3 Acciones para mitigar el impacto ambiental	6
2.2 Análisis de microplásticos	7
2.2.1 Preparación de la muestra	7
2.2.2 Detección y cuantificación de microplásticos	9
2.2.3 Identificación de microplásticos.....	10
2.3 ImageJ	10
2.4 Modelo CNN.....	11
2.4.1. Estructura del modelo CNN.....	11
2.4.2 Aplicaciones del modelo CNN.....	12
Capítulo III. Metodología.....	13
3.1 Preparación de las muestras.....	13
3.1.1 Consideraciones generales para evitar la contaminación de las muestras.....	13
3.1.2 Preparación de microplásticos	13
3.1.3 Tinción de microplásticos.....	13
3.1.4 Preparación de muestras con concentraciones conocidas de microplásticos...	14
3.1.5 Preparación de mezclas de materiales no plásticos con concentración conocida de microplásticos	14
3.2 Adquisición de imágenes.....	15
3.3 Proceso de cuantificación de microplásticos utilizando ImageJ	15
3.3.1 Procesamiento de la imagen.....	15
3.3.2 Cuantificación de microplásticos	16

3.3.3 Análisis estadístico	16
3.4 Proceso de la detección y cuantificación de microplásticos utilizando el modelo CNN	16
3.4.1 Entrenamiento y validación del modelo CNN	16
3.4.2 Estructuras del modelo CNN para la detección y cuantificación de microplásticos	17
3.4.3 Análisis estadístico	19
Capítulo IV. Resultados	20
4.1 Cuantificación de microplásticos utilizando el software ImageJ	20
4.1.1 Efecto del <i>threshold</i> en la cuantificación de microplásticos	20
4.1.2 Cuantificación de microplásticos	23
4.1.3 Análisis estadístico de la cuantificación de microplásticos	27
4.1.4 Discusión de resultados de la cuantificación de microplásticos utilizando el software ImageJ	31
4.2 Detección de microplásticos utilizando el modelo CNN	31
4.2.1 Detección de microplásticos teñidos	31
4.2.2 Detección de microplásticos sin teñir	34
4.2.3 Detección de microplásticos en mezclas con materiales no plásticos	37
4.2.4 Análisis estadístico de la detección de microplásticos	39
4.2.5 Discusión de resultados de la detección de microplásticos utilizando el modelo CNN	43
4.3 Cuantificación de microplásticos utilizando el modelo CNN	44
4.3.1 Cuantificación de microplásticos teñidos y sin teñir	45
4.3.2 Cuantificación de microplásticos en mezclas de materiales no plásticos con concentración conocida de microplásticos	48
4.3.3 Evaluación global del modelo CNN para la cuantificación de microplásticos	52
4.3.4 Discusión de resultados de la cuantificación de microplásticos utilizando el modelo CNN	58
Conclusiones	60
Trabajo Futuro	61
Referencias	62

Índice de Figuras

Fig. 2.1 Procesos físico, químico y biológico que contribuyen a la generación de MP secundarios en el ambiente acuático	5
Fig. 2.2 Estructura de un modelo CNN	12
Fig. 3.1 Sistema óptico para la toma de imágenes de MP en muestras líquidas	15
Fig. 3.2 Procesamiento de la imagen utilizando el software ImageJ	16
Fig. 3.3 Diagrama del método del tamaño de conjunto utilizado en los modelos CNN	17
Fig. 3.4 Estructura general del modelo CNN para la detección de MP	18
Fig. 3.5 Estructura general del modelo CNN para la cuantificación de MP	19
Fig. 4.1 Efecto del <i>threshold</i> en imágenes con 10 MP fluorescentes, a) imagen original de MP, b) imagen convertida en escala de grises en 8 bit, c), d), e), f) y g) imágenes con valor de <i>threshold</i> de 60, 70, 80, 90 y 100, respetivamente	20
Fig. 4.2 Valores de $\bar{x}$ para la cuantificación de MP fluorescentes con diferentes valores de <i>threshold</i> . a) 5 MP, b) 10 MP, c) 16 MP y d) 25 MP	21
Fig. 4.3 Resultados de la cuantificación de a) 5 MP, b) 10 MP, c) 16 MP y d) 25 MP	24
Fig. 4.4 Imágenes de las soluciones con 5 MP, a) imagen con partículas esféricas y b) imagen con efectos de reflexión de la luz en el menisco	25
Fig. 4.5 Imágenes de las soluciones con 10 MP, a) imagen con reflejos en el menisco y superposición de MP y b) imagen con reflejos en el menisco e interferencias causadas por la pared de la celda	25
Fig. 4.6 Imágenes de las soluciones con 16 MP, a) imagen con efectos ocasionados por la baja fluorescencia de los MP y b) imagen con efectos por la intensidad de la fluorescencia y reflejos en el menisco	26
Fig. 4.7 Imágenes de las soluciones con 25 MP, a) imagen con superposición de MP y reflejos generados por la intensidad de la fluorescencia de los MP, b) imagen con efectos generados por la baja intensidad de la fluorescencia de los MP, c) imagen con aglomeración de MP en el menisco y baja intensidad de la fluorescencia de los MP, y d) aglomeración de MP en el menisco que genera segmentos de gran tamaño	27
Fig. 4.8 Distribución de frecuencias de la cuantificación de MP, a) 5, b) 10, c) 16 y d) 25 MP	29
Fig. 4.9 Mapas de respuesta y mapas de estimación para la detección de MP teñidos para a) 5 MP, b) 10 MP y c) 16 MP respectivamente	32
Fig. 4.10 Detección de MP en a) agua HPLC y b) MP teñidos	33
Fig. 4.11 Métricas de desempeño del modelo CNN para la detección de MP teñidos: a) precisión, b) sensibilidad, c) exactitud y d) especificidad	34
Fig. 4.12 Mapas de respuesta y de estimación para la detección de MP sin teñir, a) 16 MP y b) 25 MP	35
Fig. 4.13 Detección de MP en a) agua HPLC y b) MP sin teñir	36
Fig. 4.14 Métricas de desempeño del modelo CNN para la detección de MP sin teñir: a) precisión, b) sensibilidad, c) exactitud y d) especificidad	37

Fig. 4.15 Distribución de frecuencias de los resultados de la detección de MP, a) agua HPLC, solución de tintura, b) MP teñidos, c) agua HPLC y d) MP sin teñir	40
Fig. 4.16 Distribución de frecuencias de los resultados de la detección de MP en las mezclas de materiales no plásticos con concentración conocida de MP, a) 3 MP teñidos, b) 5 MP teñidos, c) 10 MP teñidos, d) 3 MP sin teñir, e) 5 MP sin teñir y f) 10 MP sin teñir.....	42
Fig. 4.17 Concentración promedio de MP teñidos y sin teñir, cámara A y B, cuantificación de MP utilizando el modelo CNN	47
Fig. 4.18 Concentración promedio de MP teñidos y sin teñir en mezclas de materiales no plásticos con concentración conocida de MP, cuantificación de MP utilizando el modelo CNN.....	50
Fig. 4.19 Concentración promedio de MP, cuantificación de MP utilizando en modelo CNN original y reentrenado	53
Fig. 4.20 Concentración promedio de MP, cuantificación de MP utilizando el modelo CNN reentrenado	55
Fig. 4.21 Desempeño del modelo CNN.....	57
Fig. 4.22 Desempeño del modelo CNN en la cuantificación de MP promediando las 7 fases de evaluación y entrenamiento	58

Índice de Tablas

Tabla 2.1. Oxidantes más comunes utilizados para la digestión de materia orgánica en el análisis de MP	7
Tabla 2.2. Soluciones empleadas para separación por densidad	8
Tabla 4.1. Análisis estadístico de la cuantificación de MP fluorescentes en ImageJ utilizando diversos valores de <i>threshold</i>	22
Tabla 4.2. Diferencias de $\bar{x}$ con respecto al valor real y σ promedio para concentraciones de 5, 10 y 16 MP.....	23
Tabla 4.3. Análisis estadístico de la cuantificación de MP	28
Tabla 4.4. Pruebas estadísticas aplicadas a los resultados de la cuantificación de MP utilizando el software ImageJ.....	30
Tabla 4.5. Pruebas estadísticas positivas a las concentraciones de 5, 10, 16 y 25 MP....	30
Tabla 4.6. Detección de MP con el modelo CNN original con respecto al modelo CNN reentrenado	38
Tabla 4.7. Métricas de desempeño del modelo CNN para la detección de MP mezclados con materiales no plásticos.....	39
Tabla 4.8. Análisis estadístico de la detección de MP utilizando el modelo CNN	43
Tabla 4.9. Fases del robustecimiento del modelo CNN para la cuantificación de MP	44
Tabla 4.10. Cuantificación de MP con el modelo CNN y su análisis estadístico.....	48
Tabla 4.11. Resultados de la cuantificación MP en mezclas con materiales no plásticos con el modelo CNN y su análisis estadístico	50
Tabla 4.12. Comparación de errores del modelo CNN y σ de los resultados de la cuantificación de MP teñidos y sin teñir y mezclas de materiales no plásticos con concentración conocida de MP	51
Tabla 4.13. Cuantificación de MP - Evaluación global del modelo CNN.....	52
Tabla 4.14. Comparación de las diferencias promedio y σ de los resultados de la cuantificación de MP utilizando el modelo CNN, evaluación global.....	54
Tabla 4.15. Resultados de la cuantificación de MP en imágenes adquiridas con la cámara C, utilizando el modelo CNN reentrenado y su análisis estadístico	56
Tabla 4.16. Desempeño del modelo CNN.....	56

Nomenclatura

$\bar{x}$: Media

σ : Desviación estándar

CNN: Redes neuronales convolucionales

FT-IR: Espectroscopía infrarroja por transformada de Fourier

μ FT-IR: Microespectroscopía infrarroja por transformada de Fourier

GC/MS: Cromatografía de gases-espectrometría de masa

IR: Infrarrojo

MP: Microplásticos

RN: Rojo de Nilo

TGA/MS: Análisis termogravimético-espectrometría de masa

UV: Ultravioleta

Capítulo I

Introducción

En la actualidad, la producción de plásticos se ha ido incrementado exponencialmente, pasando de un millón de toneladas en 1945 a más de 367 millones en 2020, generando una gran cantidad de residuos que terminan depositados en los ecosistemas marinos y terrestres [1-3]. Particularmente, los residuos plásticos al quedar expuestos a la intemperie se degradan por la acción química, física y/o biológica generando tamaños de partícula inferiores a los 5 mm, denominados microplásticos (MP) [4-6].

Hoy en día, la contaminación por MP se ha convertido en un tema de creciente interés a nivel mundial, abarcando ámbitos como el científico, político, social y económico debido a su persistencia e impacto ambiental que provocan en los diversos ecosistemas [4,5,7-11]. En los ecosistemas marinos, los MP se han detectado en sedimentos oceánicos, aguas de profundidad media y aguas superficiales [7-10,12]. Por su parte, el estudio de los MP en cuerpos de agua dulce ha experimentado un notable incremento en los últimos años, evidenciando su presencia en el agua, sedimentos y organismos endémicos. Estas investigaciones han permitido alertar sobre sus características fisicoquímicas, distribución geográfica, tamaño de partícula, concentración, tipo y ubicación, así como sobre los efectos ambientales que provocan, similares a los observados en los ecosistemas marinos [4,7-10,13-19].

Algunas investigaciones señalan que los MP se han convertido en un contaminante emergente de la biota acuática, debido al efecto perjudicial a nivel molecular, celular, sistémico y orgánico [8,9,12,13,15]. La ingestión de MP provoca en los organismos daño físico, falsa sensación de saciedad, incrementa la respuesta inmune, agotamiento de energía, bloqueo en la producción enzimática, disminución de la fecundidad, estrés oxidativo, morbilidad, comportamiento alterado, neurotoxicidad, o incluso la muerte [3,8,12,14,15,17]. Además de ingresar a la cadena trófica, los MP se han identificado como portadores de contaminantes orgánicos y químicos persistentes, patógenos y metales pesados, debido a su gran área superficial y a sus características hidrofóbicas [12,14,15,17,20,21].

La presencia de MP también se ha detectado en alimentos y bebidas, en diversas especies de peces, crustáceos y bivalvos, sal de mesa, miel, agua potable, agua embotellada, agua mineral y cervezas [1, 8,15,16,18,21-27]. Los factores reportados que influyen en un alto consumo humano de MP son la inhalación, el agua embotellada y los azúcares [28-30].

El análisis de los MP se realiza principalmente en medios sólidos, utilizando la filtración al vacío y en algunos casos la tinción fluorescente para una detección fácil y rápida de los MP, siendo el Rojo de Nilo (RN), el colorante más eficiente por sus características hidrofóbicas [5,7,10,11,16,19,21,23,24,31-39]. Los tintes fluorescentes requieren del uso de microscopios electrónicos de alta resolución y/o cámaras profesionales con filtros especiales que les permitan detectar los MP fluorescentes, es decir, el equipo necesario para este análisis es costoso, el tiempo es mayor y requiere personal especializado [11,23,33,35,36,40,41]. Debido a lo anterior, la búsqueda de herramientas que permitan obtener resultados confiables ha llevado a la utilización de diversos tipos de software como el ImageJ, MP-VAT, Galaxy count y Matlab con los cuales se realiza la detección y

cuantificación de MP, además, se puede determinar el tamaño y la morfología de los MP [10,23,32,35,36,40,42].

En la actualidad, las investigaciones se han enfocado en el análisis de MP con la detección, cuantificación e identificación sobre medios sólidos, y en algunos casos, con técnicas visuales, lo que genera errores en los resultados por ser técnicas subjetivas. Por otro lado, los resultados reportados a la fecha muestran variabilidad, lo que dificulta la comparación y reproducibilidad entre investigaciones. Adicional a esto, el estudio de MP en muestras líquidas ha sido poco explorado, así como el uso de herramientas informáticas y de inteligencia artificial que eliminen la subjetividad durante análisis de MP [43,44].

La importancia de contar con una metodología robusta con la que se obtengan resultados exactos, reproducibles y confiables, impulsa el desarrollo del presente trabajo para realizar el análisis de MP en muestras líquidas, eliminando con ella, la subjetividad de las técnicas actualmente reportadas y los sesgos en los resultados. Además, con la metodología propuesta se evitan las etapas de digestión de la muestra y filtración al vacío, disminuyendo así el tiempo y costos requeridos para el análisis de MP. En la actualidad, algunas investigaciones recientes sobre MP reportan el uso de software y herramientas de inteligencia artificial como las redes neuronales convolucionales (CNN) por sus siglas en inglés, en la detección y cuantificación de MP, obteniendo resultados con mayor exactitud y confiabilidad, ya que esta herramienta se especializa en el análisis de imágenes permitiendo obtener características específicas de interés, logrando su clasificación y diferenciación de aquellas que resultan irrelevantes [41,45-48].

El propósito general de este trabajo es establecer una metodología para la detección y cuantificación de MP en muestras líquidas basada en el análisis de imágenes con el uso del software ImageJ y redes neuronales convolucionales (CNN), eliminando la etapa de filtración al vacío y la subjetividad en el análisis de MP. De esta manera se está desarrollando una alternativa confiable para la detección y cuantificación de los MP y además se podrán analizar los MP en cualquier tipo de muestras líquidas, obteniendo resultados de manera rápida y confiable.

1.1 Objetivos

1.1.1 General

Desarrollar una metodología para la cuantificación de microplásticos en muestras líquidas para eliminar la subjetividad en los resultados, utilizando el software ImageJ y un modelo CNN.

1.1.2 Específicos

- Seleccionar la metodología adecuada para la tinción de microplásticos utilizando el colorante fluorescente Rojo de Nilo con el fin de facilitar su detección.
- Desarrollar un sistema óptico para la adquisición de imágenes de muestras líquidas, empleando un láser azul, filtros y cámaras, que permitan la detección y cuantificación de microplásticos.

- Establecer una metodología para la cuantificación de microplásticos en muestras líquidas, mediante el procesamiento y análisis de imágenes con el software ImageJ, a fin de eliminar la subjetividad de los métodos reportados con técnicas visuales.
- Implementar el uso de redes neuronales convolucionales (CNN) para la detección y cuantificación automática de microplásticos en muestras líquidas, con el fin de sustituir las técnicas visuales eliminando la subjetividad de los métodos reportados.
- Evaluar la precisión del modelo CNN en la detección y cuantificación de microplásticos en muestras líquidas, mediante el análisis estadístico, con el propósito de validar esta técnica como una herramienta estandarizada.

Capítulo II

Marco Teórico

2.1 Microplásticos

Actualmente, la Comisión Europea, define como MP a las partículas de polímeros sintéticos con tamaño de 0.1 – 5,000 μm y forma variable, término utilizado formalmente en las investigaciones sobre el tema [5,27,49-51]. La inconsistencia en los tamaños de partícula para los MP genera una problemática en su definición, por lo cual también se utiliza el término mesoplásticos para diferenciar entre plásticos pequeños visibles al ojo humano y aquellos que sólo son detectados con el uso de microscopía [6,9,12].

2.1.1 Clasificación

Los MP se clasifican de acuerdo con diferentes características:

A) Origen

- MP primarios: son fabricados con tamaño de partícula menor a 5 mm para ser utilizados como materia prima para la producción de materiales plásticos, fibras textiles, medicamentos, productos cosméticos y de cuidado personal, tales como pastas dentales, exfoliantes faciales y corporales entre otros. También pueden ser utilizados en la tecnología de soplado de aire para proteger motores y cascos de barcos evitando la oxidación de los metales [6,12,21]. Los MP primarios se comercializan como microperlas, gránulos y esferas que pueden variar en forma, tamaño y composición [12].
- MP secundarios: se originan debido a la fragmentación y degradación física, química y biológica de plásticos de mayor tamaño [12,21]. La exposición prolongada a la luz solar y la radiación ultravioleta (UV), provoca la fotodegradación de la matriz polimérica de los plásticos lo que lleva a la ruptura del enlace haciéndolos quebradizos y susceptibles a la fragmentación. Este proceso es continuo y los fragmentos se hacen más pequeños con el tiempo hasta alcanzar un tamaño de nanoplasticos [12]. Los MP secundarios, por lo tanto, son residuos plásticos generados de las diferentes actividades antropogénicas, desechos de zonas urbanas, agrícolas y turísticas, industrias textiles y plantas de tratamiento de aguas residuales [6,12]. En la Fig. 2.1, se muestran los procesos que contribuyen a la generación de MP secundarios en el ambiente acuático.

B) Forma

- Escamas: partículas en forma de láminas delgadas y dimensionales [21].
- Esferas y microesferas: partículas duras y redondeadas también denominadas perlas [5,21].
- Espumas: partículas irregulares [6,21].
- Fibras: filamentos poliméricos uniformes [6,7,10].
- Fragmentos: partículas duras con bordes irregulares [6,7,10,21].
- Gránulos: partículas irregulares con bordes irregulares [21].
- Pellets: partículas prensadas de forma esférica o cilíndrica [6,7].
- Películas: láminas delgadas y dimensionales [6,21].

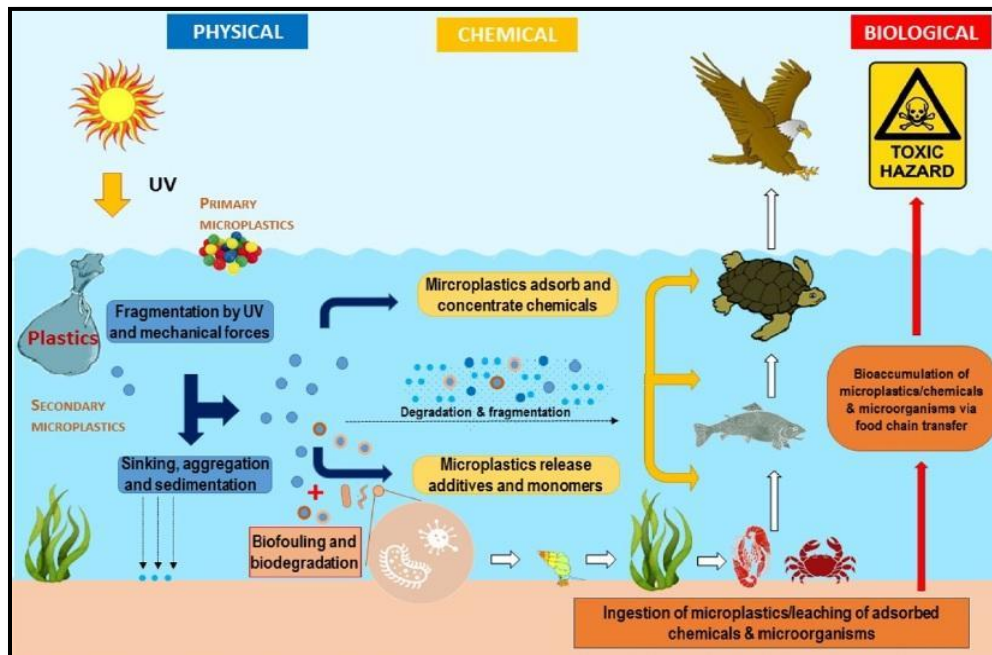


Fig. 2.1 Procesos físico, químico y biológico que contribuyen a la generación de MP secundarios en el ambiente acuático [5].

2.1.2 Impacto ambiental

El impacto ambiental de los MP se cataloga en físico, químico y biológico, las características se describen a continuación:

- **Impacto Físico:** Los MP por su tamaño, color y forma son confundidos con alimento por las especies marinas y, al ser ingeridos se introducen a la cadena trófica tanto en vertebrados como invertebrados, siendo transferidos entre los niveles tróficos, amenazando así la salud de todas las especies involucradas en la cadena trófica, incluyendo la de los humanos [6,12,21,31]. Entre los daños reportados se mencionan la morbilidad, respuestas celulares adversas, inflamación, estrés oxidativo, daño físico en órganos, cambios de comportamiento, deficiencias en el crecimiento y reproducción de las especies, disminución en la supervivencia e incluso mortalidad [12,27].
- **Impacto Químico:** Los MP pueden adsorber contaminantes presentes del medio en que se encuentran e introducir sustancias tóxicas a los diversos ecosistemas; además, la degradación de los MP genera la lixiviación de los aditivos que contienen, como ftalatos, bisfenol A, éteres de bifenilo, polibromados, hidrocarburos aromáticos policíclicos, bifenilos policlorados, metales pesados y otros contaminantes orgánicos persistentes que pueden producir efectos tóxicos en los organismos en contacto con esas sustancias y resultar potencialmente peligrosas para la biota [12,21,31]. Por otro lado, la ingestión de MP puede introducir toxinas a la cadena alimentaria incrementando el potencial de bioacumulación [12]; aunque el efecto toxicocinético y de toxicidad en los organismos vivos no ha sido documentado y no hay metodologías estandarizadas para su estudio [21].

- Impacto Biológico: Los MP pueden introducir agentes patógenos en los diversos ecosistemas debido a la formación de biopelículas sobre su superficie [4]. Además, generan daños a la salud de las diversas especies al generar obstrucción intestinal, pseudo saciedad, cambios en el metabolismo, alteraciones endocrinas, efectos negativos en la movilidad, la reproducción, el desarrollo, producen respuestas inmunes, entre otros [12,27,31].

2.1.3 Acciones para mitigar el impacto ambiental

En la actualidad la contaminación por MP es un grave problema a nivel mundial, por lo tanto, es importante desarrollar métodos sistemáticos y estandarizados para el monitoreo de MP y, además, de la generación de políticas públicas regulatorias sobre el uso y remoción de MP, así como establecer políticas globales mediante el tratado mundial de plásticos [27,52-54]. Algunas acciones que se han aplicado para disminuir el impacto ambiental provocado por la contaminación por MP se han establecido en función de las fuentes de ingreso a los diversos ecosistemas y son las siguientes [5,6,52-54]:

- La utilización y consumo de plásticos debe controlarse a través de la legislación y programas de sensibilización sobre su uso. Hasta Julio de 2018, el 66% de los países del mundo habían adoptado algún tipo de legislación regulatoria con respecto al uso de MP en la elaboración de productos, así como con la restricción al uso de bolsas y plásticos de un solo uso para disminuir la generación de MP secundarios.
- Fomentar el uso y consumo responsable de plásticos, sensibilizando y concientizando a la población sobre el impacto de los MP en el medio ambiente, recomendando la reutilización, la reducción en el consumo o sugiriendo al consumidor seleccionar materiales biodegradables y/o compostables como sustitución de los plásticos convencionales.
- Remoción de MP presentes en los ecosistemas mediante el desarrollo de tecnologías para la remoción de MP empleando herramientas de ingeniería, uso de polímeros biodegradables y herramientas biotecnológicas, que permitan optimizar la eliminación de MP en los ecosistemas. Algunas tecnologías para la remoción de MP son las siguientes [5,52-55]:
 - a. Desarrollo e investigación de técnicas de reciclaje eficiente para evitar la fragmentación de los plásticos de mayor tamaño a MP. Entre las principales técnicas que se han estudiado son el reciclaje mecánico, químico, biodegradación asistida, de valor añadido y con inteligencia artificial, técnicas con las cuales se puede mejorar la sostenibilidad ambiental disminuyendo la cantidad de MP y transformándolos ya sea en materias primas o productos de mayor calidad.
 - b. Herramientas de ingeniería para optimizar el tratamiento de aguas residuales, como la microfiltración, tratamientos secundarios y terciarios más novedosos y disminuir la cantidad de MP en los efluentes de salida, también se emplean filtros biológicamente activos, tratamientos mecánicos, químicos, biológicos, procesos fisicoquímicos y electrocoagulación.
 - c. Limpieza de cuerpos de agua mediante la implementación de programas de recolección de residuos plásticos en los ecosistemas o a través del uso de polímeros

biodegradables elaborados con base de almidón, celulosa, lignina y bioetanol para disminuir la presencia de plásticos sintéticos en el medio ambiente.

- d. Herramientas biotecnológicas para establecer técnicas y condiciones para la biodegradación, utilizando bacterias, hongos y enzimas, impulsando así la investigación y desarrollo de estudios sobre degradación de plásticos para medir y rastrear su presencia en el medio ambiente.

2.2 Análisis de microplásticos

El análisis de MP comprende desde su detección y cuantificación hasta la identificación, con lo cual se evalúan características cualitativas y cuantitativas como el tamaño, forma y color de los MP, la composición y concentración de cada tipo de polímero [44,56]. El análisis de los MP inicia con la recolección y preparación de las muestras para posteriormente utilizar otras técnicas como la tinción fluorescente, microscopia, espectrofotometría con técnicas y equipos especializados que se describen a continuación.

2.2.1 Preparación de la muestra

La recolección y toma de muestras para el análisis de MP depende de las necesidades de cada estudio, la muestra requiere un tratamiento previo a la detección, cuantificación e identificación de MP, independientemente de la técnica empleada y del análisis a realizarse.

- A) Separación de MP. Para realizar la separación de MP de los componentes de la muestra ambiental, existen diferentes métodos como los que se detallan a continuación:
 - i. Separación por coagulación: Consiste en el uso de un coagulante para separar los MP de tamaño entre, 10^{-6} – 10^{-9} m. Durante el proceso de coagulación es fundamental tener una distribución homogénea de los MP y el coagulante. Los principales coagulantes utilizados para separar MP, son las sales de aluminio y hierro [58].
 - ii. Digestión de la materia orgánica: Se basa en la oxidación y degradación de la materia orgánica contenida en la muestra para evitar errores en los resultados del análisis de MP, ya que la materia orgánica puede causar falsos positivos en la detección y cuantificación de MP [3,21]. En la Tabla 2.1, se presentan los principales oxidantes empleados para la digestión de materia orgánica y es importante mencionar que algunos de estos oxidantes pueden degradar los MP [21].

Tabla 2.1. Oxidantes más comunes utilizados para la digestión de materia orgánica en el análisis de MP [5,10,21].

Agente Oxidante	Concentración	Características – Ventajas	Desventajas
H ₂ O ₂	10% y 30%	El daño que causa a los MP es insignificante.	Puede afectar el tamaño de los MP.
Mezcla de H ₂ O ₂ con ácidos minerales	-	Pueden utilizarse ácidos minerales como: H ₂ SO ₄ , Fe (II), HNO ₃ , HClO ₄ , HCl	Los ácidos oxidantes, H ₂ SO ₄ y HNO ₃ , tienen la capacidad de degradar los MP con poca tolerancia a un pH ácido.
Mezcla de H ₂ O ₂ con bases fuertes	10 M	Puede utilizarse: KOH, NaOH	El NaOH 10 M a 60°C, tiene una efectividad del 90% para degradar la materia orgánica, sin

			embargo, un aumento en la concentración y/o temperatura ocasiona la degradación de los MP.
Uso de Enzimas	-	Mezcla de lipasa, amilasa, proteinasa, quitinasa y celulosa para eliminar proteínas, lípidos y carbohidratos. La enzima proteinasa-K tiene una eficiencia de remoción de biomateriales del 97%	La enzima proteinasa-K tiene alto costo, y el manejo de sus desechos es complejo y también costoso.

- iii. Filtración. La filtración utilizada va desde el simple colado hasta separaciones más complejas como la filtración al vacío [59]. La filtración al vacío utiliza una fuerza impulsora para que el líquido pase a través del filtro, esa fuerza es la que ejerce la presión atmosférica cuando se aplica vacío al sistema. Este tipo de filtración es el más utilizado en el análisis de MP [60].
- iv. Separación de MP por densidad del polímero. Esta técnica, además de separar los MP de la muestra que los contiene, logra diferenciar el tipo de polímero de acuerdo con su densidad [4]. En la Tabla 2.2, se presentan las soluciones más empleadas para la separación de MP por densidad, así como sus ventajas y desventajas.

Tabla 2.2. Soluciones empleadas para separación por densidad [3,5,10,31,36,61].

Solución	Densidad	Características – Ventajas		Desventajas
NaCl	1.2 kg/L	Bajo costo, no tóxico. Rango de densidad 1.6 – 1.8 kg/L. Realizar por triplicado este procedimiento permite alcanzar hasta un 93% de eficiencia.		Utilidad limitada para MP con densidades de 1.41-1.61 kg/L y para partículas con tamaños < 1 mm ya que solo se logra una separación de MP del 40%.
Politungstato de sodio	1.4-1.5 kg/L	No tóxico		Alto costo
CaCl ₂	1.3 kg/L	-		Causa interferencia en las mediciones.
NaCl	1.8 kg/L	Alta eficiencia de separación		Alto costo, requiere cuidados de manejo.
ZnCl ₂	1.5 – 1.7 kg/L	Alta eficiencia de separación		Es peligroso y considerado como un contaminante ambiental.

- B) Tinción de MP con tintes fluorescentes. El uso de tintes fluorescentes para la detección de MP es una técnica a bajo costo, que ha sido utilizada en diversas investigaciones debido a que es un enfoque diferencial cuantitativo que permite una estimación rápida de la cantidad de MP. La tinción fluorescente también se emplea en microscopia óptica para mejorar el contraste de los MP y facilitar su detección, además permite distinguir los MP de otras partículas tanto orgánicas como inorgánicas [62,63].

Los tintes más utilizados en la tinción de fibras textiles son el tinte rosa 456, azul 451, Kentucky Sky 2283, rojo de aceite EGN, eosina B, rosa de Bengala, amarillo Hostasol 3G, azul básico 24, violeta cristal, azul de lactofenol, rojo neutro, safranina T, azul tripán y RN; es importante mencionar que el RN demostró ser el más eficiente en términos de adsorción e intensidad de fluorescencia [35,36,40,64]. El colorante RN es solvatocrómico y su espectro de emisión de fluorescencia varía dependiendo de la polaridad del disolvente y de la superficie del polímero, su longitud de onda de máxima absorción se desplaza hacia longitudes de onda más cortas a medida que decrece la polaridad del disolvente. Además, el RN es fotoestable y su fluorescencia no varía en pH entre 4.5 - 8.5, emite fluorescencia en una gama de colores que va desde el amarillo hasta el rojo intenso [35,63,64]. Entre los disolventes más utilizados se encuentran la acetona y el n-hexano, también se ha estudiado el metanol, n-heptano, cloroformo, xileno y etanol, siendo los disolventes no polares los que ofrecen mayor ventaja en la tinción de MP [33,40,62].

El colorante RN ha sido reportado como uno de los más eficientes en el análisis de MP ya que se adhiere a la mayoría de los polímeros, excepto el nylon [37]. Además, los MP teñidos con RN, pueden ser detectados visualmente cuando se hace incidir luz azul o ultravioleta, lo que permite diferenciarlos de otros compuestos orgánicos e inorgánicos [36].

2.2.2 Detección y cuantificación de microplásticos

La detección y cuantificación de MP se realiza comúnmente con técnicas visuales, sin embargo, el uso de equipos más especializados disminuye la subjetividad de los resultados.

- Visual. Es una técnica rápida, sencilla, económica y comúnmente utilizada para la cuantificación y clasificación de los MP en varias categorías, principalmente basadas en el color, tamaño y morfología del polímero, sin embargo, esta técnica tiene limitaciones debido a que la dificultad de distinguir MP de otros materiales puede generar falsos positivos y/o negativos, siendo los resultados poco confiables [6,21,31,44].
- Microscopio óptico y de fluorescencia. Cuando el tamaño de los MP es menor a 1mm, se recomienda el uso de microscopios ópticos y de fluorescencia [6]. En el caso de los microscopios de fluorescencia, se emplea una fuente de luz con una longitud de onda específica para excitar los fluoróforos en la muestra, lo que provoca la fluorescencia, emisión de luz a una longitud de onda mayor [64]. Para la detección y cuantificación de MP, se utilizan técnicas de tinción fluorescente que facilitan su análisis. Estos equipos permiten determinar tanto el tamaño como la morfología de los MP. Los MP teñidos con RN emiten fluorescencia cuando se irradian con luz azul, y su cuantificación se basa en la observación al microscopio de los MP y el conteo se realiza de forma manual por un observador, por lo cual se convierte en una técnica subjetiva [4].
- Cámaras fotográficas: Para mejorar la precisión y confiabilidad de los resultados, es posible utilizar imágenes de MP teñidos y realizar la cuantificación automatizada mediante el uso de software especializado, para lo cual se emplean cámaras fotográficas, una fuente de excitación de luz azul, LED o láser, y un filtro naranja. Esta técnica de análisis permite reducir el margen de error, aumentando la exactitud y confiabilidad de los resultados [19,28].

2.2.3 Identificación de microplásticos

La identificación de MP se puede realizar utilizando técnicas espectrofotométricas, como Infrarroja, IR, y Raman, cromatografía de gases-espectrometría de masa (GC/MS) y análisis termogravimétrico-espectrometría de masa (TGA/MS) [6,21,45].

La espectroscopia IR, FT-IR o μ -FT-IR es una técnica confiable para la identificación de MP. Cada polímero posee un espectro IR específico con patrones de bandas distintos entre sí [6]. La FT-IR es el método más comúnmente utilizado en la identificación de MP en muestras de sedimentos y agua previa separación de la matriz que los contiene; esta técnica de identificación de MP tiene un amplio campo de aplicación para aquellas muestras que contengan MP y deban ser identificados [45]. La espectroscopia Raman es una técnica muy utilizada para identificar MP en tamaños inferiores a $1\mu\text{m}$. En el caso de la identificación de MP con tamaños inferiores a $20\mu\text{m}$ se utiliza la espectroscopia μ -Raman [6].

Actualmente, el análisis de la composición de un MP mediante espectroscopia infrarroja por transformada de Fourier FT-IR, espectroscopia μ -Raman y cromatografía de gases por pirólisis con espectrometría de masas, son técnicas que se aplican comúnmente y que permiten determinaciones confiables sobre la cantidad y la composición de MP en una muestra, sin embargo, estos métodos requieren equipos especializados y tiempos de análisis prolongados [62,66].

2.3 ImageJ

El software ImageJ es un programa desarrollado en Java por el Instituto Nacional de Salud (NIH). Es un software de uso gratuito y su código fuente de dominio público, lo que permite que los usuarios puedan modificarlo, haciendo aportaciones significativas mediante complementos, macros, o scripts; esto hace que el usuario pueda personalizar las herramientas disponibles del software para su investigación [33,67].

Este software ha sido ampliamente utilizado para el procesamiento de imágenes, en el ámbito médico, clínico, y científico, entre otros. En general el ImageJ puede aplicarse para conocer características específicas dentro de una imagen, su amplia funcionalidad está a las necesidades e interés particular de cada investigación y de las habilidades del usuario para utilizar al máximo el potencial que ofrece el software.

El análisis de MP con el software ImageJ permite determinar diferentes características como tamaño, forma, área de superficie, perímetro, circularidad, cantidad de partículas, por mencionar algunos. Otra ventaja importante de ImageJ es la disponibilidad de herramientas que permiten procesar gran cantidad de imágenes utilizando los códigos predeterminados conocidos como macros [67-69].

El protocolo para el análisis de MP utilizando ImageJ incluye el tratamiento de la imagen, comenzando con su conversión a escala de grises en 8-bit. Posteriormente, se procede a la selección del *threshold* y la cuantificación de MP [67,68]. La selección del *threshold* es una etapa crítica, ya que influye significativamente en los resultados de la cuantificación. Este proceso se basa en la identificación de píxeles, diferenciando aquellos que pertenecen al primer plano de los del fondo según el valor del *threshold* seleccionado [69].

Durante la binarización de la imagen, los píxeles del primer plano, los objetos de interés se muestran en blanco, mientras que el fondo se muestra en negro. ImageJ ofrece diversas

herramientas de binarización, aunque se recomienda utilizar la opción del algoritmo IsoData. Esta opción equilibra la reducción del ruido de fondo y la optimización del reconocimiento de MP fluorescentes, proporcionando así una mejor señal-ruido y disminuyendo la tasa de falsos positivos. En ImageJ, cualquier píxel que no alcance el nivel de fluorescencia establecido se presenta en negro, mientras que los que lo cumplen se presentan en blanco [23].

ImageJ es una alternativa eficaz para sustituir el análisis visual de MP eliminando la subjetividad en su detección y cuantificación. Su uso dentro del protocolo de análisis de MP garantiza resultados confiables y permite una caracterización cuantitativa de las características de los MP [67]. Además, esta herramienta destaca por ser una opción sencilla, rápida y económica para el análisis de MP [66].

2.4 Modelo CNN

Las redes neuronales convolucionales, CNN, son un modelo de redes neuronales artificiales para aprendizaje profundo, DL, especializadas en el procesamiento y análisis de imágenes con el objetivo de reconocer objetos, clases y categorías [70]. Un modelo CNN se basa en los mecanismos de visión de la corteza visual del ojo humano, su funcionamiento se enfoca en la extracción de características específicas de la imagen, por lo cual, el modelo CNN ha sido una herramienta dominante y eficaz en tareas de visión por computadora y proporciona resultados confiables en el reconocimiento de objetos en una imagen, datos de audio y señales, además de tener la capacidad de procesar gran cantidad de información de manera rápida [46,47,49,71,72].

El modelo CNN es un algoritmo que asigna pesos y sesgos a varios objetos de la imagen y aprende a diferenciarlos. El procesamiento previo de la imagen requerido es menor en comparación con respecto a otros algoritmos de clasificación. Una ventaja del modelo CNN es la capacidad de aprender los filtros necesarios que le son alimentados como información durante su entrenamiento [71]. Además, es capaz de procesar grandes cantidades de imágenes e identificar diversas características en la imagen analizada [45,47].

2.4.1. Estructura del modelo CNN

La estructura de un modelo CNN consta de una capa de entrada, una capa de salida y varias capas ocultas entre ellas, como se muestra en la Fig. 2.2. Las capas ocultas de la estructura del modelo CNN puede estar conformada por decenas o cientos de ellas, y cada una aprende a detectar diferentes características en la imagen, las capas van reduciendo la imagen por lo que se requiere menor tiempo y esfuerzo computacional para su análisis [46].

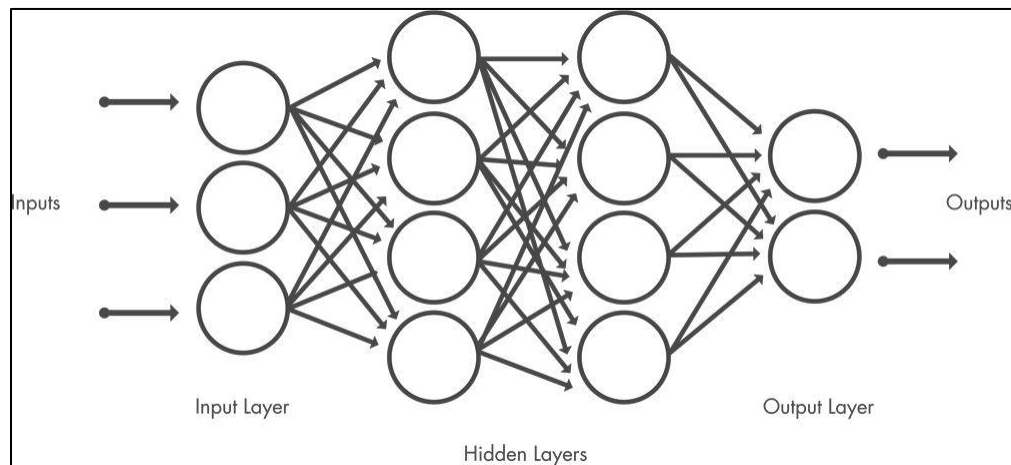


Fig. 2.2 Estructura de un modelo CNN [70].

A cada capa se le conoce como operación de convolución, cuyo objetivo es extraer las características de interés de la imagen de entrada. Un modelo basado en CNN no está limitado por el número de capas, sin embargo, convencionalmente, las primeras capas son responsables de aprender las características generales de la imagen, como bordes, color, orientación del degradado que se refiere a la dirección en la que los colores se mezclan o desvanecen entre sí, por mencionar algunos de los más significativos; en las capas subsecuentes el modelo CNN aprende y reconoce las características específicas de interés [71].

2.4.2 Aplicaciones del modelo CNN

- Análisis de imágenes médicas. Los modelos CNN son utilizados para analizar informes anatomopatológicos en la detección visual de células cancerosas en las imágenes y determinar la presencia o ausencia de dichas células [70].
- Procesamiento de audio. Los modelos CNN se utilizan para la detección de palabras y frases clave en dispositivos con micrófono para poner en funcionamiento equipos específicos a través del reconocimiento de voz [70].
- Detección de objetos. Los modelos CNN se utilizan para detectar señales y objetos con alta precisión para tomar decisiones en base al resultado, por ejemplo, en la conducción automática [70].
- Generación de datos sintéticos. Los modelos CNN son modelos que identifican patrones existentes y pueden reproducirlos, por lo tanto, adicional al procesamiento de imágenes con los modelos CNN se pueden adicionar redes generativas antagónicas para generar nuevas imágenes para el desarrollo de otras aplicaciones especializadas como el reconocimiento facial y conducción autónoma [70].

El empleo de los modelos CNN ha ido en aumento, llegando a diversos campos de estudio, entre los que destacan, el mecánico, el químico y el biológico [42]. Además, los modelos CNN también se utilizan en temas de ciberseguridad, procesamiento del lenguaje natural, bioinformática, robótica y control [70]. En el ámbito de la contaminación por MP, los modelos CNN se han utilizado hasta ahora para detectar la presencia de MP en suelos [47]. La combinación de un modelo CNN con la espectroscopia Raman se ha empleado para la identificación de MP de manera rápida y con valores de exactitud superiores al 96% [49].

Capítulo III Metodología

Las consideraciones generales para evitar la contaminación de las muestras, preparación de MP, tinción de MP y preparación de muestras con concentración conocida de MP teñidos y sin teñir, la preparación de mezclas de materiales no plásticos con concentración conocida de MP teñidos y sin teñir, así como la adquisición de imágenes se describen a continuación.

La cuantificación de MP utilizando el software ImageJ se realizó en imágenes de soluciones preparadas con concentración conocida de MP. Se prepararon 5 muestras de cada concentración que corresponde a 5, 10, 16 y 25 MP.

La detección de MP utilizando el modelo CNN se llevó a cabo en diferentes tipos de soluciones: agua HPLC sin MP, soluciones con concentraciones conocidas de MP teñidos y sin teñir de 5, 10, 16, 20, 25, 30, 40 y 45, soluciones con materiales no plásticos teñidos y sin teñir; y mezclas de materiales no plásticos con MP teñidos y sin teñir con concentraciones de 3, 5 y 10.

La cuantificación de MP utilizando el modelo CNN se realizó en: soluciones con concentración conocida de MP teñidos y sin teñir de 5, 10, 16, 20, 25, 30, 40 y 45, así como mezclas de materiales no plásticos con MP teñidos y sin teñir con concentraciones de 3, 5 y 10.

3.1 Preparación de las muestras

3.1.1 Consideraciones generales para evitar la contaminación de las muestras [73].

- Usar batas de algodón dentro del laboratorio.
- Limpiar las superficies del laboratorio con etanol al 30%.
- Enjuagar los materiales con agua desionizada y etanol al 30%.
- Usar guantes de nitrilo libres de polvo.

3.1.2 Preparación de microplásticos

Los MP se obtuvieron de bolsas comerciales de polietileno, PE, marca REYMA® adquiridas en comercializadora “Plásticos COMTE”. Las bolsas se procesaron mediante fragmentación, corte y molienda para obtener las partículas de MP. El tamaño de partícula utilizado fue entre 250 y 500 μm .

3.1.3 Tinción de microplásticos

a) Preparación de la solución madre de RN en metanol [41].

- Pesar la cantidad necesaria del colorante RN para preparar una solución con concentración de $10 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$.
- Agregar 5 mL de metanol al vaso de precipitado que contiene el colorante RN y agitar durante 10 minutos a 100 rpm.

- Agregar 2 mL de metanol al vaso de precipitado que contiene la solución de RN y agitar durante 5 minutos a 100 rpm.
- Agregar la solución de RN a un matraz aforado de volumen correspondiente a la cantidad que se requiera preparar y aforar con metanol.
- Agitar la solución madre de RN durante 15 minutos a 100 rpm.
- Filtrar al vacío la solución madre de RN, utilizando un filtro Whatman GF/F, de 70 mm de diámetro, y de 0.7 μm de tamaño de poro [1].
- Almacenar la solución madre de RN en un frasco ámbar con rosca y mantener en la oscuridad a 4°C [34].

Nota: Debido a que el RN es fotosensible, la solución debe resguardarse de la luz durante su preparación y almacenamiento.

b) Tinción

- Agregar la cantidad necesaria de MP en un matraz ámbar aforado.
- Agregar la cantidad necesaria de la solución madre de RN para preparar una solución con concentración de 1 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ de RN y aforar con agua HPLC.
- Agitar la solución durante 15 minutos a 100 rpm.
- Reposar en la oscuridad durante 24 horas a temperatura ambiente [36].

Nota: Adicional a la tinción de MP, se debe preparar una solución de tintura de la misma forma que en la tinción de MP. Esta solución será utilizada para la preparación de las muestras líquidas con concentración conocida de MP.

3.1.4 Preparación de muestras con concentraciones conocidas de microplásticos

a) Microplásticos teñidos

- Colocar en una celda de vidrio la cantidad de MP teñidos según corresponda a la concentración de 5, 10, 16, 20, 25, 30, 40 y 45 MP.
- Añadir 3.5 mL de la solución de tintura en la celda de vidrio.
- Reposar en la oscuridad durante 24 horas a temperatura ambiente

b) Microplásticos sin teñir

- Colocar en una celda de vidrio la cantidad de MP sin teñir según corresponda a la concentración de 5, 10, 16, 20, 25, 30, 40 y 45 MP.
- Añadir 3.5 mL de agua HPLC en la celda de vidrio.
- Reposar en la oscuridad durante 24 horas a temperatura ambiente.

3.1.5 Preparación de mezclas de materiales no plásticos con concentración conocida de microplásticos

- Pesar 0.5 g de cada uno de los siguientes materiales: fibra de vidrio, naturaleza muerta, madera y MDF.
- Agregar los materiales pesados a un matraz aforado de un litro.
- Agregar agua HPLC hasta su aforo.
- Agitar la solución durante 15 minutos a 100 rpm.
- Colocar en la celda de vidrio la cantidad correspondiente de MP teñidos o sin teñir según corresponda, 3, 5 y 10 MP.

- Añadir 3.5 mL de la mezcla de materiales no plásticos teñida o sin teñir según corresponda.
- Reposar en la oscuridad durante 24 horas a temperatura ambiente.

Nota: En las muestras preparadas únicamente con la mezcla de materiales no plásticos, se omite la adición de los MP en la celda.

3.2 Adquisición de imágenes

Las imágenes de los MP teñidos y sin teñir en soluciones acuosas fueron tomadas utilizando un sistema óptico que consta de un láser azul (450 nm), un lente circular, una platina movable, un filtro, 570 nm y una cámara, ver Fig. 3.1. Para la adquisición de las imágenes se utilizaron 3 cámaras diferentes, c922 Pro Stream Webcam (cámara A), Microsoft® Life Cam Cinema™ (cámara B) y Canon Rebe T5i EOS 700D (cámara C). La adquisición de imágenes con MP teñidos se realizó utilizando un filtro naranja, mientras que, para las imágenes de MP sin teñir se utilizó un filtro polarizador. El total de imágenes tomadas para cada etapa de la investigación se señalan en su sección correspondiente de resultados.

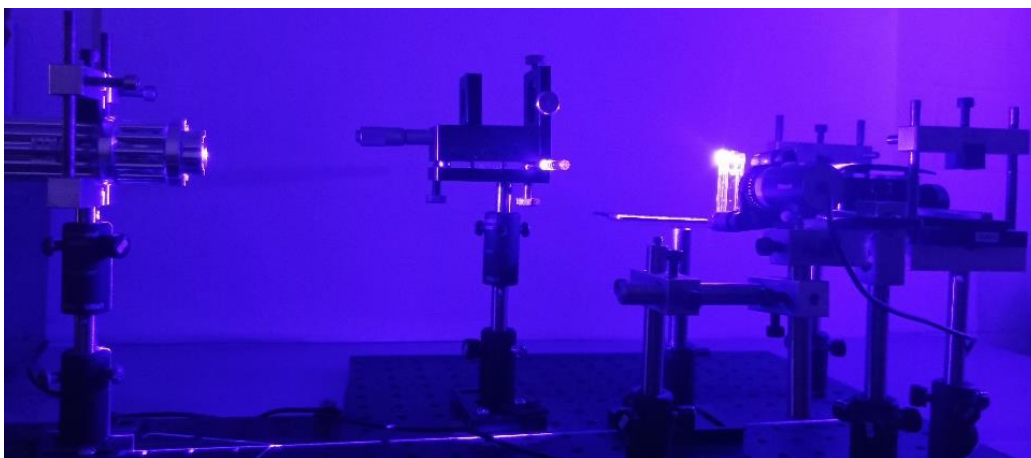


Fig. 3.1 Sistema óptico para la toma de imágenes de MP en muestras líquidas.

3.3 Proceso de cuantificación de microplásticos utilizando ImageJ

3.3.1 Procesamiento de la imagen

La imagen original debe ser convertida en una imagen de escala de grises, en 8-bit, formato necesario para realizar la cuantificación de MP. La umbralización de la imagen o binarización, conocido como "*thresholding*", que es una conversión de la imagen en escala de grises a una imagen binaria clasificando el valor de cada píxel según su nivel de intensidad. Es importante mencionar que el *threshold* es un parámetro crítico en la cuantificación de MP, ya que ayuda a distinguir los objetos del fondo, clasifica el valor de cada píxel como blanco o rojo según su nivel de intensidad en comparación con el valor del umbral. En este estudio se utilizaron diversos valores de *threshold* para evaluar el valor óptimo que permita determinar qué partículas de la imagen son MP. La herramienta utilizada para determinar el valor óptimo de *threshold* fue un algoritmo ISOData incluido en el software, ver Fig. 3.2.

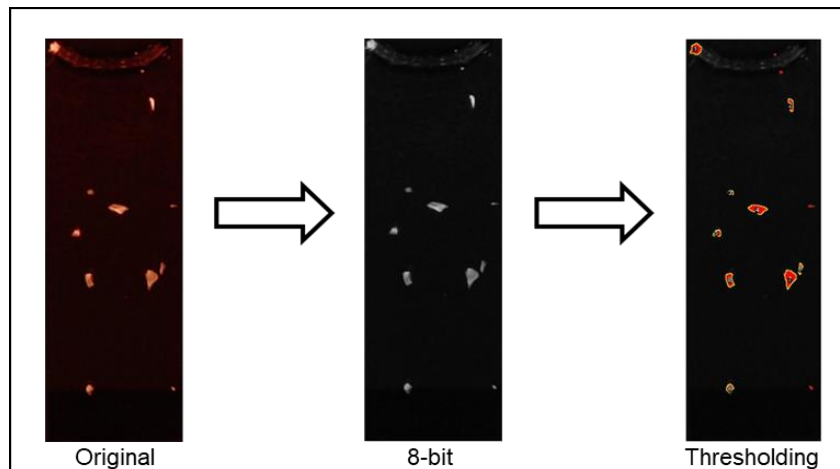


Fig. 3.2 Procesamiento de la imagen utilizando el software ImageJ.

3.3.2 Cuantificación de microplásticos

La cuantificación de MP se realizó con la imagen procesada y con el valor de threshold seleccionado, estableciendo un límite de detección de tamaño de partícula de 25 pixel² para evitar la interferencia del ruido de la imagen en los resultados de la cuantificación.

3.3.3 Análisis estadístico

Los resultados de la cuantificación de MP teñidos se analizaron estadísticamente con el software Minitab 18®, V18.1, se calcularon los parámetros estadísticos descriptivos básicos, media, mediana, moda, varianza y desviación estándar. Posteriormente se realizaron diversas pruebas estadísticas para evaluar el comportamiento de los datos. Las pruebas utilizadas fueron la de normalidad de Anderson-Darling, pruebas de ajuste mediante las transformaciones de BoxCox y Johnson, lognormal, exponencial, Weibull, valor extremo mínimo y máximo, gamma, logística, loglogística y la prueba de bondad de ajuste para una distribución uniforme de Poisson. Además, se utilizaron pruebas no paramétricas, como la prueba de signos, que evalúa si la mediana es igual a un valor específico, y la prueba de Wilcoxon, en todas ellas se utilizó intervalo de confianza del 95% [74].

3.4 Proceso de la detección y cuantificación de microplásticos utilizando el modelo CNN

3.4.1 Entrenamiento y validación del modelo CNN

La detección y cuantificación de MP utilizando el modelo CNN se llevó a cabo en un procesador Intel® Core (TM) i7-7700HQ CPU 2.80GHz 16 GB RAM and NVIDIA GPU GeForce GTX 1060 6 GB. Para este modelo, se ejecutaron un total de 32 pruebas de entrenamiento utilizando un optimizador ADAMS, gradiente descendiente, con una tasa de aprendizaje de 0.001. Para el entrenamiento del modelo CNN se utilizó el 50 % de las imágenes y se ejecutaron 180 épocas de aprendizaje, otro 25 % de imágenes fue utilizado para la validación y el 25 % restante para la evaluación de los modelos, llamado método del tamaño de conjunto, ver Fig. 3.3.

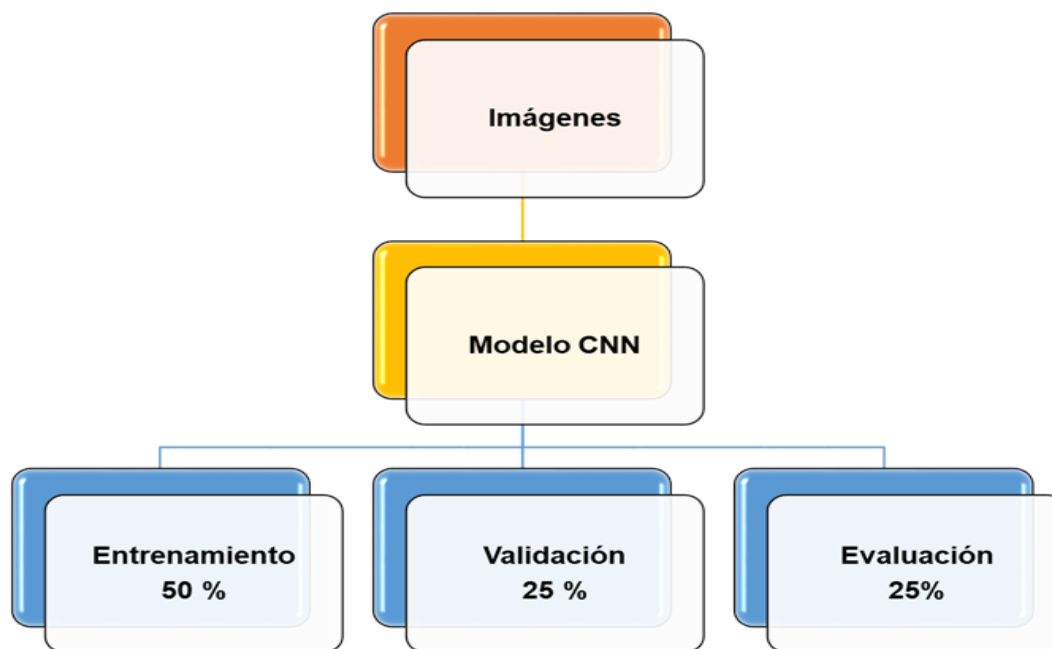


Fig. 3.3 Diagrama del método del tamaño de conjunto utilizado en los modelos CNN.

3.4.2 Estructuras del modelo CNN para la detección y cuantificación de microplásticos

En la Fig. 3.4, se presenta la estructura general de modelo CNN para la detección de MP, las salidas de este modelo son los mapas de respuesta y mapas de estimación, mientras que el resultado final es la probabilidad de la presencia o ausencia de MP en la imagen, reportadas como 1 y 0 respectivamente. Por otra parte, en la Fig. 3.5, se presenta la estructura general del modelo CNN para la cuantificación de MP cuyas salidas son el vector de intersimilitud óptica con el cual se calcula la concentración de MP y se emite el resultado final como un valor numérico de la cantidad de MP en la imagen.

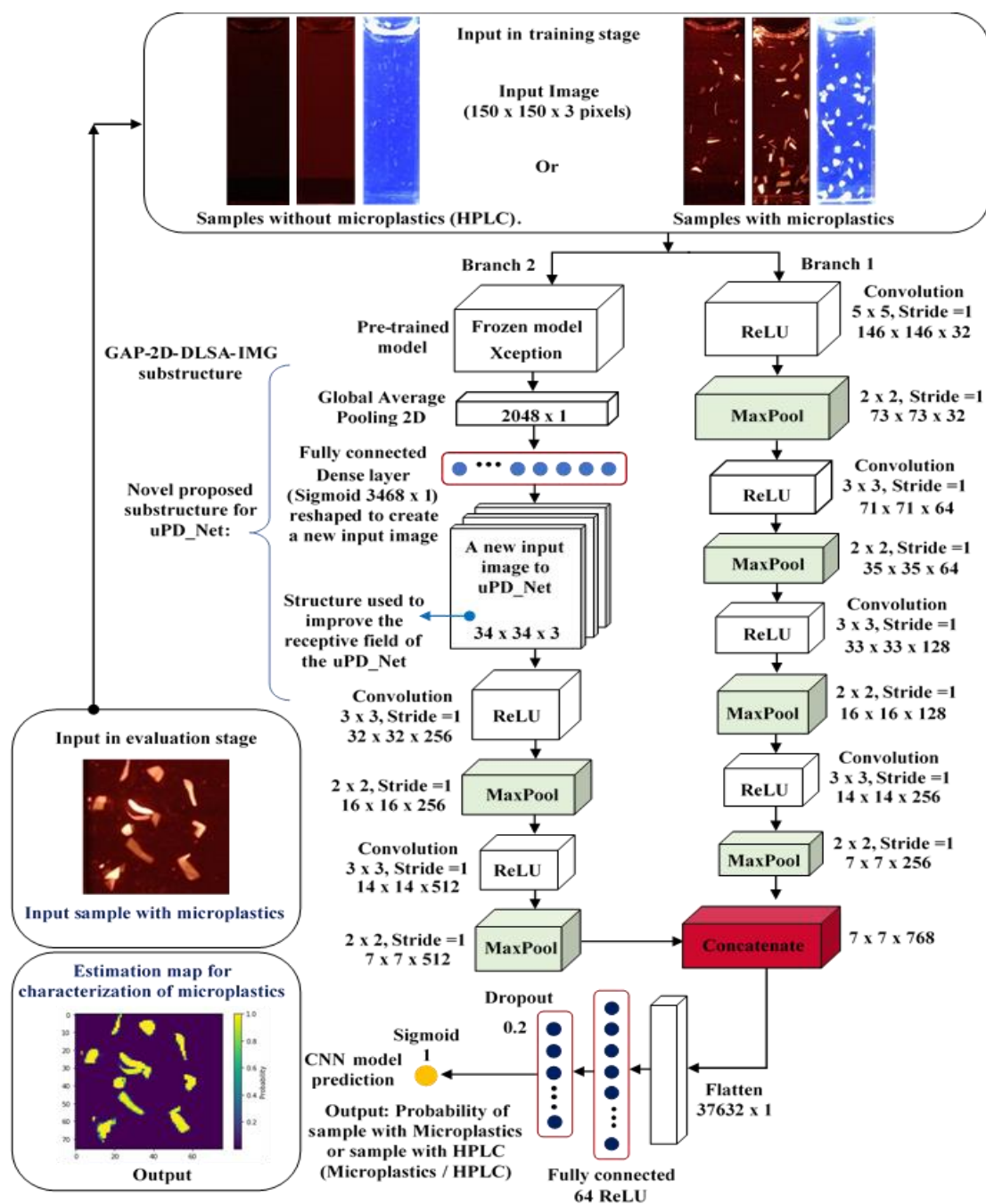


Fig. 3.4 Estructura general del modelo CNN para la detección de MP.

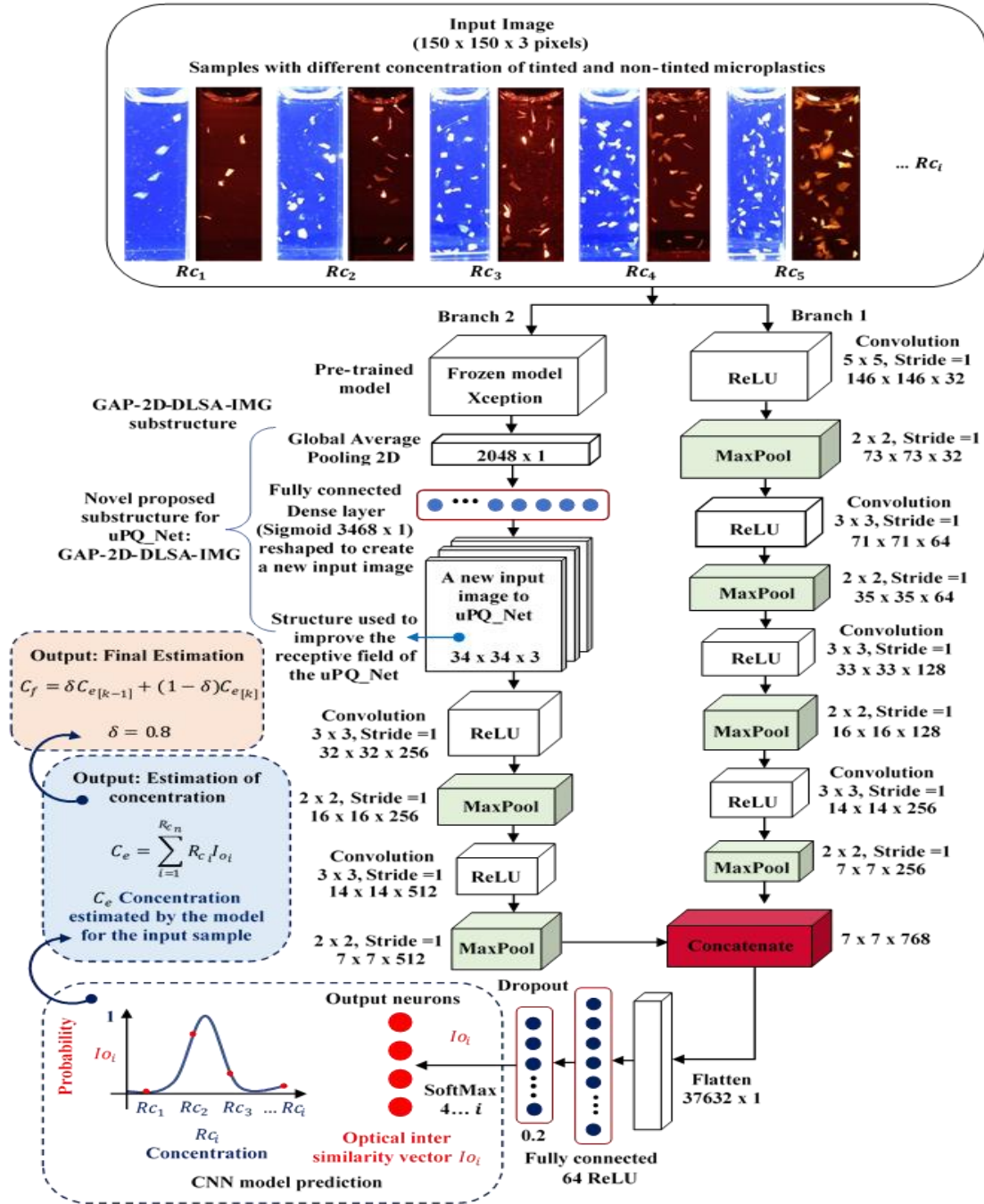


Fig. 3.5 Estructura general del modelo CNN para la cuantificación de MP.

3.4.3 Análisis estadístico

Los resultados de la cuantificación de MP se analizaron estadísticamente con el software Minitab 18® 18.1 utilizando la prueba normal de Anderson-Darling, y un intervalo de confianza del 95% [74].

Capítulo IV Resultados

4.1 Cuantificación de microplásticos utilizando el software ImageJ

Un total de 250 imágenes fueron tomadas de cada concentración y se prepararon 5 soluciones de MP por concentración.

4.1.1 Efecto del *threshold* en la cuantificación de microplásticos

El *threshold* es un parámetro importante en la cuantificación de MP fluorescentes utilizando el software ImageJ, ya que influye significativamente en los resultados y origina una infraestimación o sobrestimación de MP presentes con respecto a la concentración real. El *threshold* proporciona un equilibrio óptimo entre la reducción de falsos positivos del ruido de fondo y el reconocimiento de MP fluorescentes, además, proporciona una mejor relación señal–ruido y permite la identificación de píxeles por encima del valor del *threshold*, en primer plano, y por debajo, en el fondo de la imagen [23,70]. Durante la binarización de la imagen, el *threshold* clasifica las intensidades de los píxeles en una imagen para crear la representación binaria, es decir, los píxeles de los MP que cumplen con el valor de *threshold* seleccionado se muestran en rojo, en el primer plano de la imagen, ver Fig. 3.2.

Un total de 1,000 imágenes de diferentes concentraciones de MP fluorescentes en muestras líquidas fueron procesadas y analizadas con ImageJ, para evaluar el efecto del *threshold* en la cuantificación de MP. Los valores de *threshold* empleados fueron de 60 a 100 en intervalos de 5 unidades. El efecto del *threshold* en las imágenes es perceptible a simple vista, como se muestra en la Fig. 4.1, donde se muestra que, a medida que el valor de *threshold* aumenta, la cantidad de MP detectada en la imagen disminuye afectando así los resultados de la cuantificación.

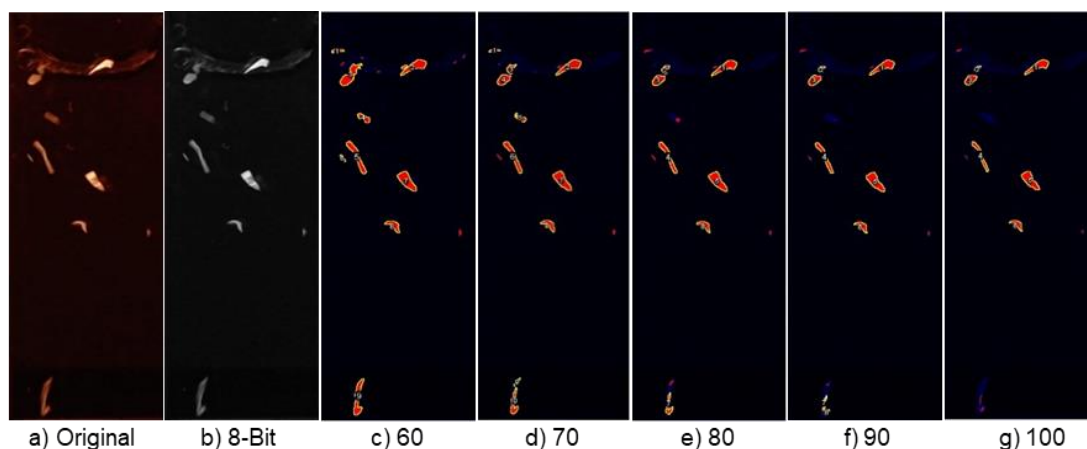


Fig. 4.1 Efecto del *threshold* en imágenes con 10 MP fluorescentes, a) imagen original de MP, b) imagen convertida en escala de grises en 8 bit, c), d), e), f) y g) imágenes con valor de *threshold* de 60, 70, 80, 90 y 100, respetivamente.

En las cuatro concentraciones de MP analizadas, se observa un patrón generalizado en el que la variabilidad de los resultados aumenta a medida que el valor de *threshold* se

incrementa, lo que origina que el valor de la media ($\bar{x}$), se aleje del valor de la concentración real, es decir se cuantifica menor cantidad de MP. La concentración con la mayor variabilidad es la de 25 MP que con valor de *threshold* de 100 se obtiene una $\bar{x}$ = 15 MP, lo que representa una diferencia de 10 MP con respecto al valor real. Las gráficas de la Fig. 4.2 muestran que el *threshold* influye en los resultados de cuantificación de MP en ImageJ. Esto se debe a que cualquier píxel que no alcanzó el nivel establecido de *threshold* se muestra en color negro, mientras que los que cumplen con el criterio aparecen en color rojo, ver Fig. 3.2 y 4.1 [23].

En la Fig. 4.2 se muestra el efecto del *threshold* en la cuantificación de MP en la cual es posible observar que conforme se incrementa este parámetro se disminuye la cantidad de MP detectados. El análisis estadístico de los parámetros descriptivos básicos que se presenta en la Tabla 4.1 indica que los valores de $\bar{x}$ disminuyen mientras que la desviación estándar (σ) aumenta. Además, que para 5 MP un *threshold* de 80 es el que origina la menor variabilidad en los resultados, para 10 MP un *threshold* de 70, mientras que para 16 y 25 MP el *threshold* de 60 genera un valor más cercano a la concentración real.

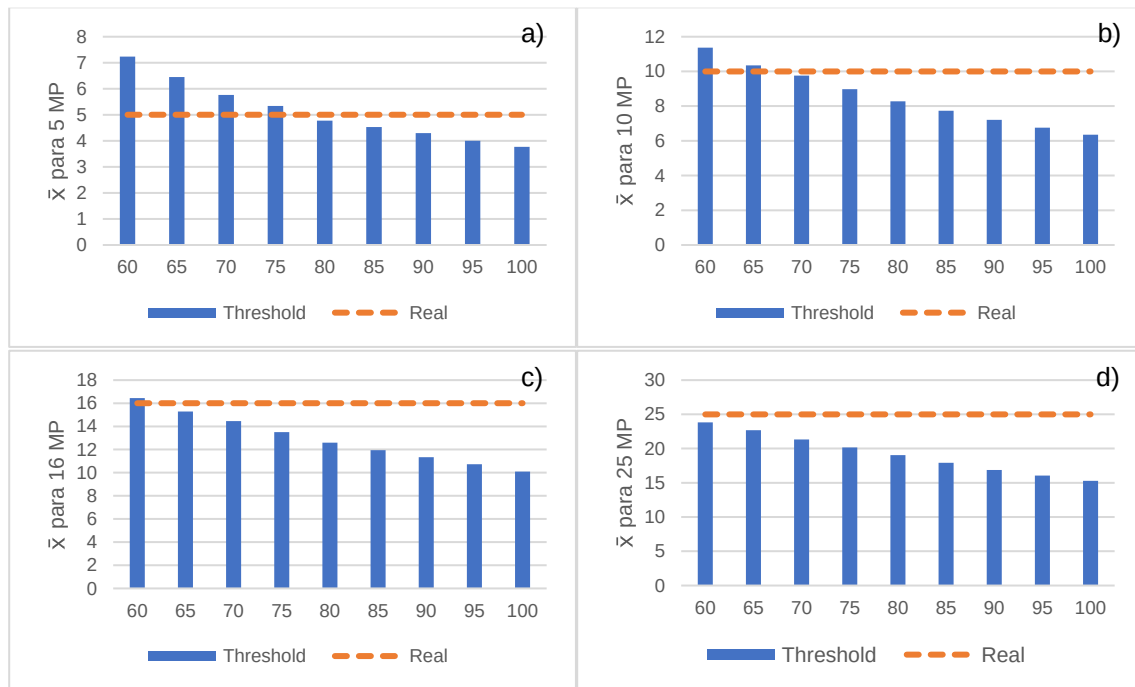


Fig. 4.2 Valores de $\bar{x}$ para la cuantificación de MP fluorescentes con diferentes valores de *threshold*. a) 5 MP, b) 10 MP, c) 16 MP y d) 25 MP.

De acuerdo con el análisis estadístico de los parámetros descriptivos básicos mostrados en la Tabla 4.1, en la concentración de 25 MP, a medida que el *threshold* aumenta, la desviación de $\bar{x}$ con respecto al valor real también se incrementa, mostrando una mayor dispersión de los datos, evidenciada por un incremento significativo de los valores de la desviación estándar (σ), alcanzando valores de hasta 8.49. Este comportamiento también se observa en la Fig. 4.2 para 25 MP.

Para establecer una metodología confiable para la cuantificación de MP, es fundamental definir un valor absoluto de *threshold* que pueda aplicarse en las diferentes

concentraciones, minimizando la variabilidad en los resultados [23]. Para la estandarización del valor de *threshold*, se calcularon las diferencias promedio entre los valores de $\bar{x}$ y el valor real, así como de las σ promedio obtenidas en el análisis estadístico. En este cálculo se consideraron únicamente los valores de $\bar{x}$ y σ obtenidos para las concentraciones de 5, 10 y 16 MP. La concentración de 25 MP se descarta por presentar desviaciones significativas de $\bar{x}$ con respecto al valor real y elevadas desviaciones (σ), ver Tabla 4.2. Los resultados indican que las menores diferencias promedio de $\bar{x}$ con respecto al valor real corresponden a los valores de *threshold* de 65 y 70, los cuales presentan valores similares. Para determinar cuál de estos valores de *threshold* genera menor dispersión en la cuantificación de MP, se analizaron los valores de σ , observándose que con el *threshold* de 70 se obtiene una menor dispersión de los resultados de la cuantificación de MP. Con el valor de *threshold* de 70, la desviación promedio del valor de $\bar{x}$ con respecto al valor real es de 0.85 MP, y la σ promedio para las tres concentraciones analizadas es de 3.47. El uso de un *threshold* adecuado permite equilibrar la imagen, reduciendo la posibilidad de falsos positivos y asegurando una detección precisa de los MP para su cuantificación, de lo contrario, se puede presentar la infraestimación o sobreestimación de MP. Por lo tanto, se seleccionó el valor de 70 como el *threshold* óptimo debido a que arrojan los resultados más cercanos a su respectivo valor real y menor valor de σ .

Tabla 4.1. Análisis estadístico de la cuantificación de MP fluorescentes en ImageJ utilizando diversos valores de *threshold*.

[MP]	<i>Threshold</i>	Media	Desv. Est.	Mediana	Moda	N-Moda
5	60	7.232	3.749	6	4, 5	40
	65	6.448	3.722	5	4	50
	70	5.764	3.118	5	3	51
	75	5.340	2.977	5	3	50
	80	4.772	2.663	4	3	47
	85	4.528	2.479	4	3	52
	90	4.296	2.417	4	3	49
	95	4.004	2.226	4	2	55
	100	3.768	2.112	3	2	58
10	60	11.368	4.053	11	9	25
	65	10.348	3.936	10	9	29
	70	9.756	3.877	9.5	9	29
	75	8.976	3.626	9	8	32
	80	8.272	3.378	8	7	33
	85	7.732	3.372	8	8	30
	90	7.212	3.285	7	7	29
	95	6.760	3.231	7	8	30
	100	6.356	3.173	6	4	33
16	60	16.440	3.520	16	14	32
	65	15.284	3.344	15	14	36
	70	14.460	3.421	14	15	40
	75	13.508	3.355	13	12	32

	80	12.592	3.142	12	11	38
	85	11.940	3.123	12	12	34
	90	11.336	3.160	11	11	37
	95	10.732	3.215	11	10	34
	100	10.100	3.218	10	10	31
25	60	23.820	5.788	24	31	20
	65	22.668	6.477	22	22	19
	70	21.332	6.931	21	15, 18	16
	75	20.164	7.379	19	18	17
	80	19.040	7.703	18	12	24
	85	17.928	7.978	16.5	13	20
	90	16.876	8.359	14.5	11	18
	95	16.044	8.487	13	7	18
	100	15.288	8.457	12	10	21

Tabla 4.2. Diferencias de $\bar{x}$ con respecto al valor real y σ promedio para concentraciones de 5, 10 y 16 MP.

<i>Threshold</i>	Diferencia Promedio de $\bar{x}$ con respecto al valor real	σ Promedio
60	1.347	3.774
65	0.837	3.667
70	0.849	3.472
75	1.285	3.319
80	1.788	3.061
85	2.267	2.991
90	2.719	2.954
95	3.168	2.891
100	3.592	2.834

4.1.2 Cuantificación de microplásticos

La cuantificación de MP para concentraciones de 5, 10, 16 y 25 MP se realizó utilizando el valor de *threshold* de 70. En la Fig. 4.3 se muestran los resultados obtenidos de cada una de las imágenes de cada concentración. En general, los resultados indican que, la cuantificación de MP utilizando el ImageJ con un valor de *threshold* de 70, son confiables ya que los valores de $\bar{x}$ para cada concentración son cercanos al valor real y los valores de σ no son mayores 4.

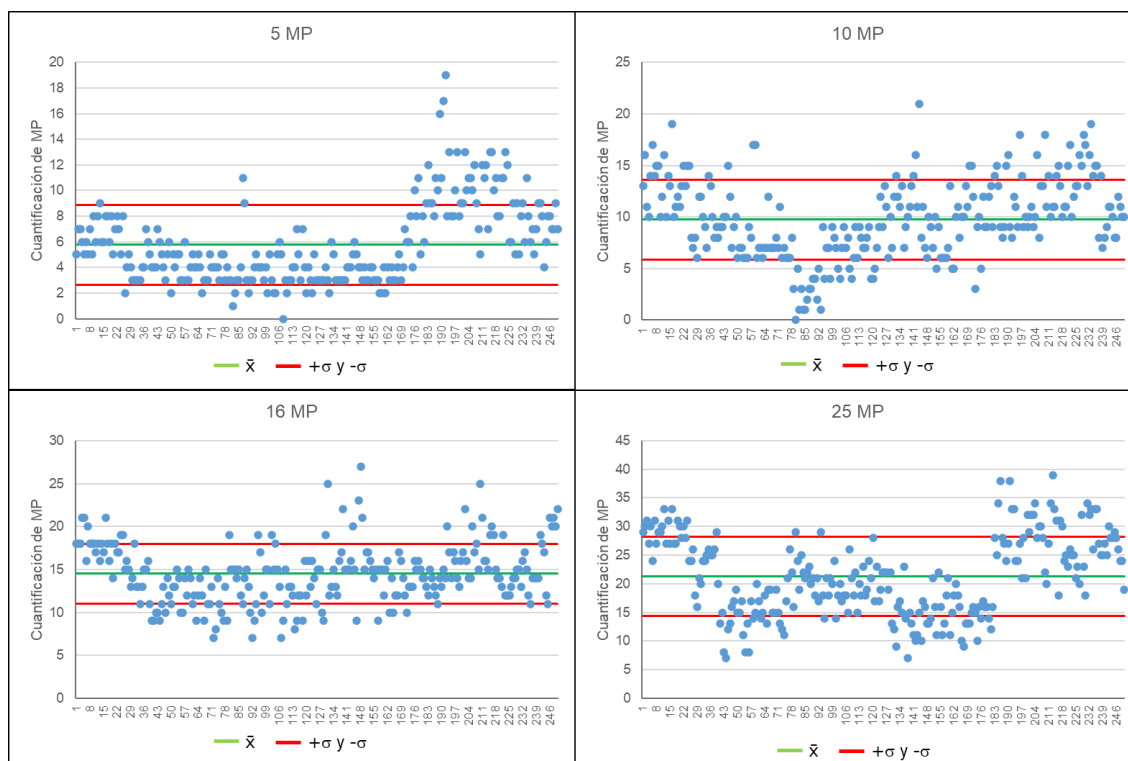


Fig. 4.3 Resultados de la cuantificación de a) 5 MP, b) 10 MP, c) 16 MP y d) 25 MP.

En la concentración de 5 MP la diferencia entre su resultado máximo y mínimo es de 19 MP, con un 13.2% de los resultados coincidiendo con el valor real. Para 10 MP la diferencia entre el resultado máximo y mínimo es de 21 MP con un 10.4% de sus resultados igual a su valor real. En el caso de la concentración de 16 MP, la diferencia entre el resultado máximo y mínimo es de 20 MP, con un 8,4% de los valores obtenidos coincidiendo con el valor real. Estas tres concentraciones muestran un comportamiento similar en la dispersión de los datos. Por otro lado, la mayor dispersión de datos se observa en la concentración de 25 MP, con una diferencia de 32 MP entre el resultado máximo y mínimo, y solo un 4.4% de los valores obtenidos coincidiendo con el valor real.

Por otro lado, es importante mencionar que la calidad de la imagen o ciertas características presentes en la misma puede influir en la variabilidad de los resultados de la cuantificación de MP, como los reflejos y/o superposición de los MP, partículas no plásticas y aglomeración de MP en el menisco de la celda, entre otros. La Fig. 4.4a) muestra algunas partículas esféricas, sin embargo, con el *threshold* seleccionado, no son cuantificadas como MP; por otro lado, en la Fig. 4.4b), se observa que el menisco ocasiona que algunos efectos de la reflexión de la luz se cuantifiquen erróneamente como MP, generando variabilidad con respecto al valor real.

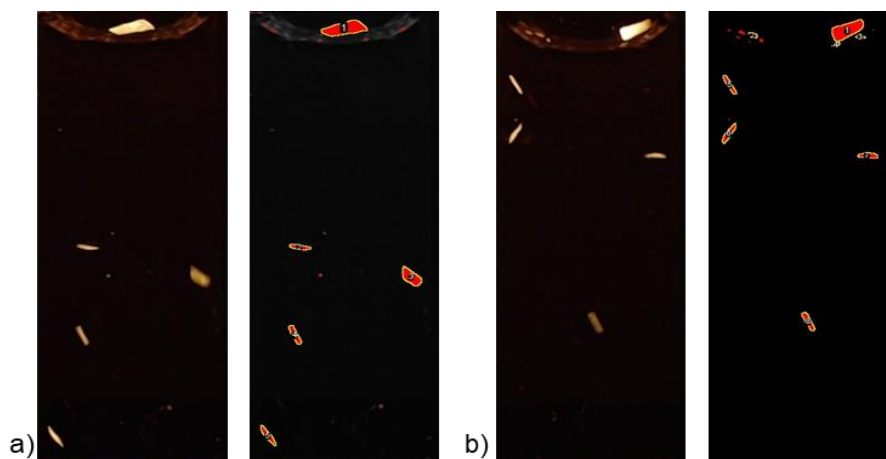


Fig. 4.4 Imágenes de las soluciones con 5 MP, a) imagen con partículas esféricas y b) imagen con efectos de reflexión de la luz en el menisco.

Algunas imágenes con concentración de 10 MP, muestran la presencia de partículas no plásticas, reflejos en el menisco y la superposición de MP sin que esto afecte el resultado de la cuantificación, ver Fig. 4.5a). No obstante, en la Fig. 4.5b), el resultado de la cuantificación si es afectado por reflejos en el menisco, la detección parcial de un MP doblado y la interferencia de la pared de la celda en la parte inferior. En la concentración de 16 MP, la Fig. 4.6a) además de reflejos en el menisco, se detecta la pérdida de 2 MP. En la Fig. 4.6b), se muestra otro ejemplo con numerosos reflejos en el menisco, se observa la superposición de partículas y la pérdida de MP. Las imágenes de las Fig. 4.6a) y b) también evidencian el efecto de la intensidad de la fluorescencia. La baja fluorescencia ocasiona que los píxeles no alcancen el umbral establecido con el valor de *threshold* seleccionado y aparecen en negro en lugar de rojo, lo que impide que sean considerados en la cuantificación, generando así una cuantificación de MP errónea, así mismo se presentan reflejos en el menisco.

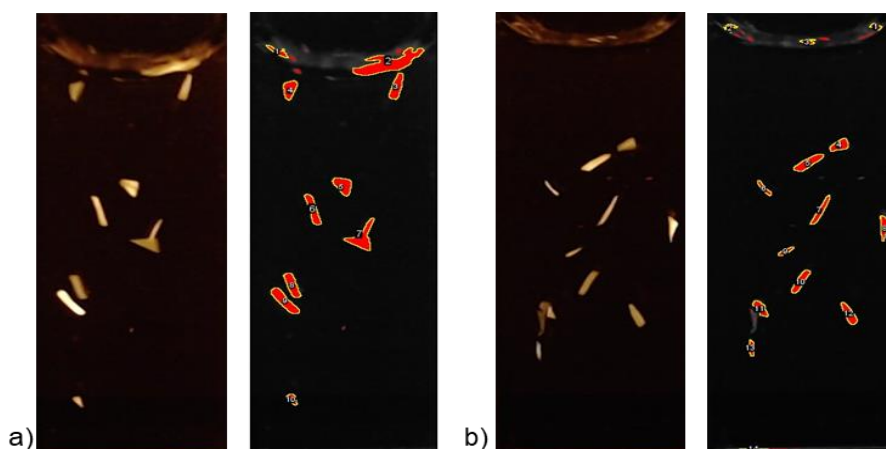


Fig. 4.5 Imágenes de las soluciones con 10 MP, a) imagen con reflejos en el menisco y superposición de MP y b) imagen con reflejos en el menisco e interferencias causadas por la pared de la celda.

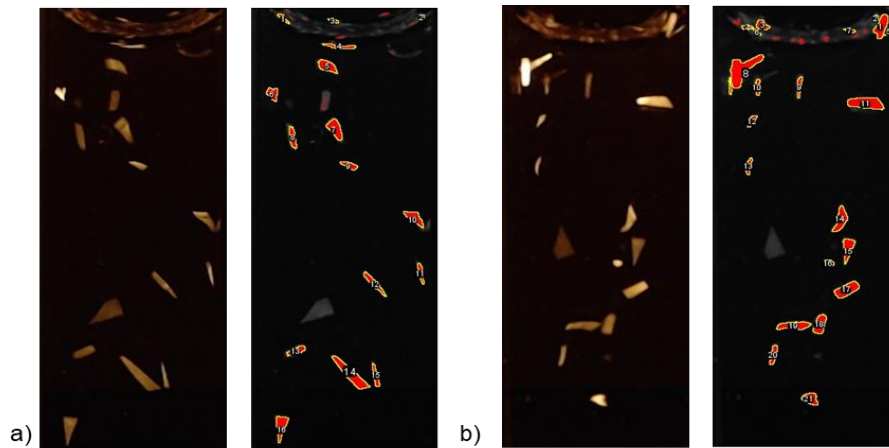


Fig. 4.6 Imágenes de las soluciones con 16 MP, a) imagen con efectos ocasionados por la baja fluorescencia de los MP y b) imagen con efectos por la intensidad de la fluorescencia y reflejos en el menisco.

La concentración de 25 MP presenta la mayor dispersión de los resultados debido a algunos factores como la superposición de MP y reflejos generados por la intensidad de la fluorescencia, además, la presencia de MP en el menisco amplifica los reflejos en la imagen dando un resultado de 33 MP, ver Fig. 4.7a). Otro factor que influye en la dispersión de los datos es la baja intensidad en la fluorescencia de algunos MP originando la pérdida significativa de MP, ver Fig. 4.7b). En la Fig. 4.7c), se observa aglomeración de MP en el menisco y baja intensidad de la fluorescencia de algunos MP, lo que ocasiona una infraestimación de MP. En la Fig. 4.7d), se muestra como la aglomeración de partículas en el menisco forma segmentos de gran tamaño, lo que también ocasiona una infraestimación de MP al contabilizar varios MP como uno.

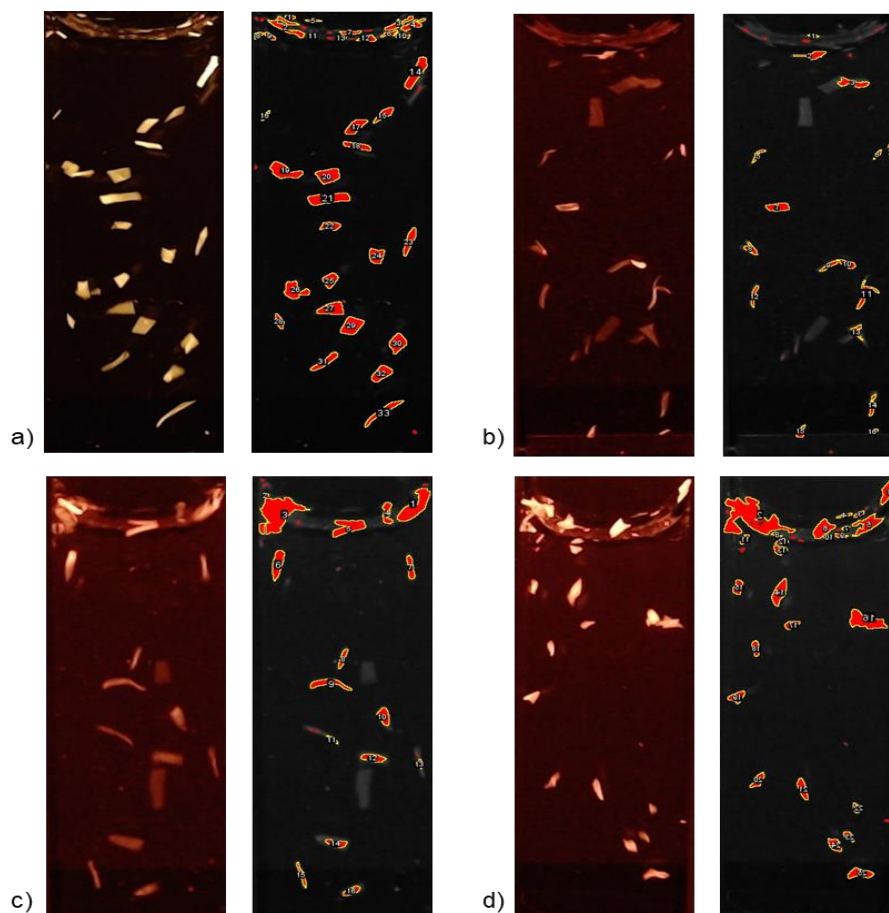


Fig. 4.7 Imágenes de las soluciones con 25 MP, a) imagen con superposición de MP y reflejos generados por la intensidad de la fluorescencia de los MP, b) imagen con efectos generados por la baja intensidad de la fluorescencia de los MP, c) imagen con aglomeración de MP en el menisco y baja intensidad de la fluorescencia de los MP, y d) aglomeración de MP en el menisco que genera segmentos de gran tamaño.

4.1.3 Análisis estadístico de la cuantificación de microplásticos

El análisis de los parámetros descriptivos básicos aplicado a los resultados de la cuantificación de MP permitió evaluar la precisión y dispersión de los datos obtenidos para diferentes concentraciones de MP. En general, los valores de $\bar{x}$ de las concentraciones de 5, 10 y 16 MP tienden a los valores reales, con desviaciones estándar, σ , de 3.12, 3.88 y 3.47, respectivamente. No obstante, para la concentración de 25 MP se observa una mayor variabilidad en los datos, ya que el valor de $\bar{x}$ es de 21.33 y con una desviación de 4 MP con respecto al valor real, presentando σ de 6.93. Estos resultados, mostrados en la Tabla 3.3, evidencian un incremento en la variabilidad de los datos conforme aumenta la concentración.

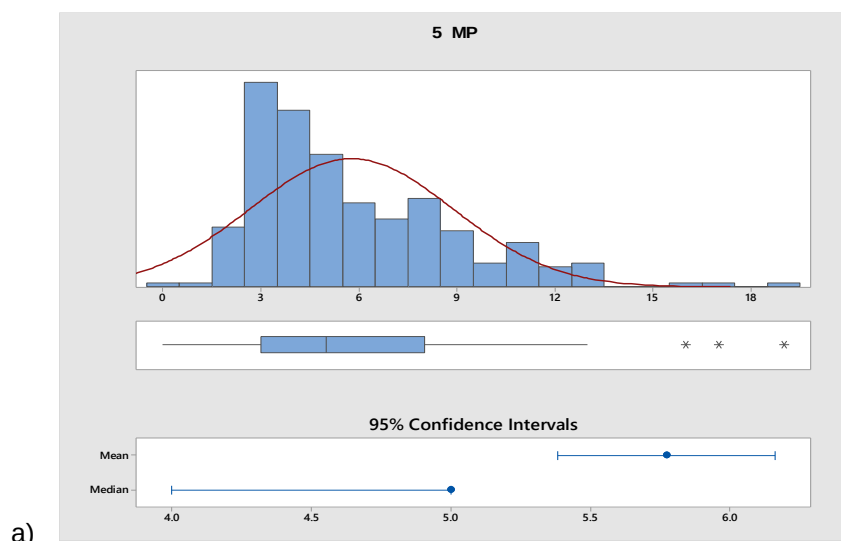
Tabla 4.3. Análisis estadístico de la cuantificación de MP.

Variable	Promedio	Desviación Estándar	Varianza	Mediana	Moda	N para Moda
5 MP	5.77	3.12	9.73	5	3	51
10 MP	9.76	3.88	15.03	9.5	9	29
16 MP	14.49	3.47	12.03	14	15	40
25 MP	21.33	6.93	48.04	21	15, 18	16

En la Fig. 4.3 se presentan las gráficas de dispersión de las concentraciones de 5, 10, 16 y 25 MP, la dispersión de los datos es menor para las concentraciones de 5 y 16 MP, como se muestra en la Fig. 4.3 a) y c), en comparación con 10 y 25 MP, representadas en las Fig. 4.3 b) y d). En particular, la concentración de 25 MP muestra la mayor dispersión de datos, lo que coincide con los resultados estadísticos previamente mencionados y sugiere una mayor variabilidad en las mediciones cuando se utilizan concentraciones más elevadas.

La distribución de frecuencias, representada en la Fig. 4.8, muestra que para concentraciones de hasta 16 MP, los resultados pueden considerarse confiables, ya que el valor de $\bar{x}$ es cercano al valor real y σ presenta un valor de 3.49. No obstante, en el caso de la concentración 25 MP, se observa una mayor dispersión en los datos, con un valor de $\bar{x}$ que se aleja del valor real y un incremento significativo en σ , como se muestra en la Tabla 4.3. Estos resultados confirman la tendencia de que a mayor concentración la variabilidad de los resultados se incrementa.

El análisis estadístico de los parámetros descriptivos básicos indica que la cuantificación de MP en muestras líquidas utilizando el software ImageJ es confiable hasta una concentración de 16 MP. A partir de 25 MP, el valor promedio de $\bar{x}$ se aleja del valor real y σ se incrementa de manera significativa, incluso si se realiza un conteo visual en las imágenes. Es importante mencionar que las imágenes de las soluciones con 25 MP muestran aglomeración y superposición de MP, lo que podría ser la causa de una mayor variabilidad y dispersión en los resultados.



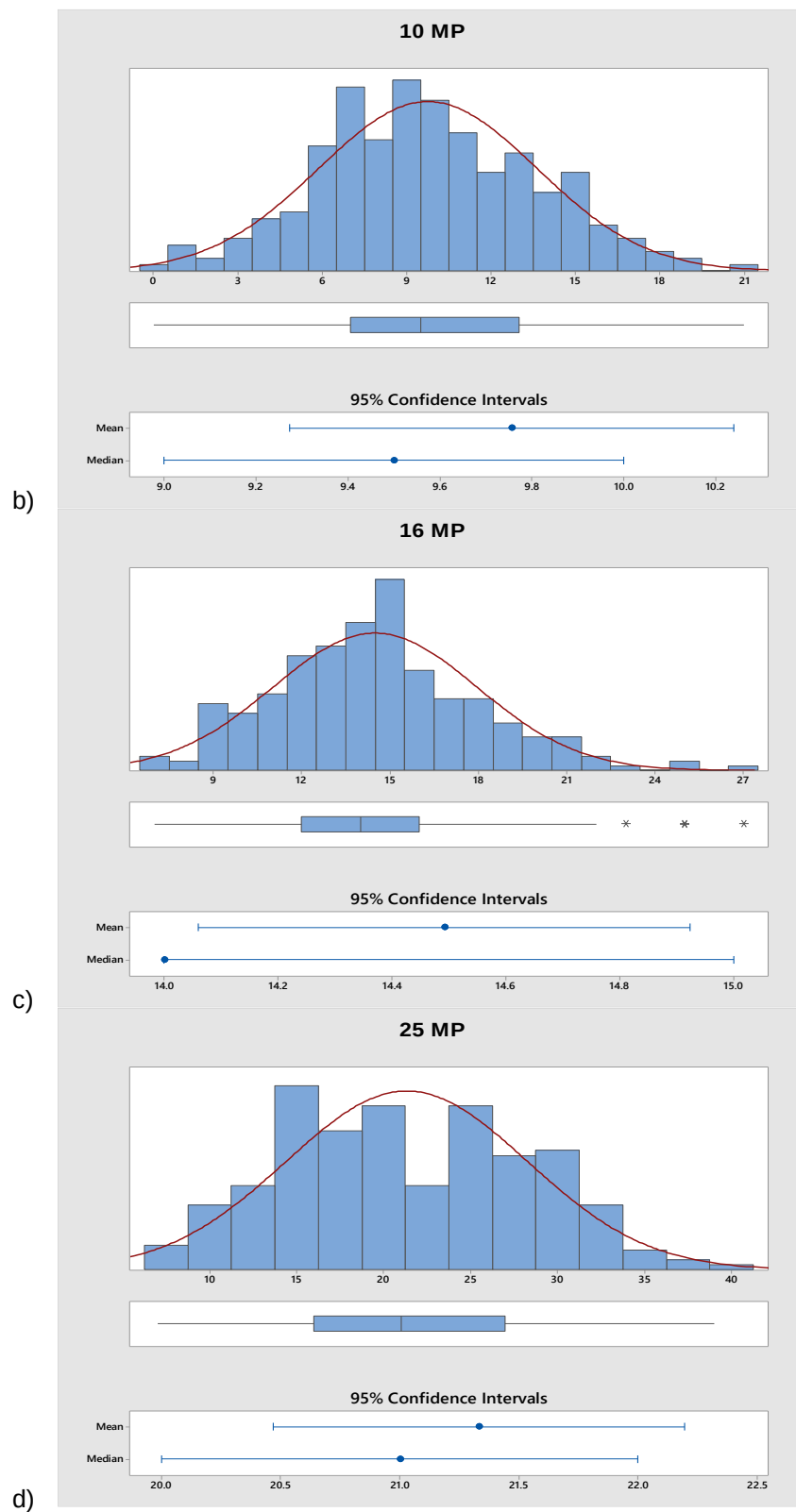


Fig. 4.8 Distribución de frecuencias de la cuantificación de MP, a) 5, b) 10, c) 16 y d) 25 MP.

La prueba de Anderson–Darling se aplicó a los resultados de la cuantificación de MP utilizando el software ImageJ e indica que los datos no siguen una distribución normal, por lo tanto, se aplicaron otras pruebas estadísticas para determinar si los datos se ajustan a cierta distribución específica o presentan un comportamiento no paramétrico. Los resultados de las pruebas estadísticas aplicadas se muestran en la Tabla 4.4, y esto permitió validar la confiabilidad de los resultados para la cuantificación de MP en muestras líquidas. En la Tabla 4.5 se muestra un resumen de las pruebas estadísticas que resultan estadísticamente significativas para cada una de las concentraciones analizadas.

Tabla 4.4. Pruebas estadísticas aplicadas a los resultados de la cuantificación de MP utilizando el software ImageJ.

Prueba Estadística	5 MP		10 MP		16 MP		25 MP	
	Parámetro Crítico	Valor de p	Parámetro Crítico	Valor de p	Parámetro Crítico	Valor de p	Parámetro Crítico	Valor de p
Anderson-Darling	7.307	<0.005	1.321	<0.005	1.719	<0.005	1.463	<0.005
Transformación Box-Cox	3.858	<0.005	1.524	<0.005	1.719	<0.005	1.463	<0.005
Lognormal	2.595	<0.005	4.957	<0.005	12.141	<0.005	1.996	<0.005
Lognormal 3 parámetros	2.651	*	1.208	*	1.701	*	1.299	*
Exponencial	31.299	<0.003	45.078	<0.003	65.874	<0.003	51.471	<0.003
Exponencial 2 parámetros	18.791	<0.010	38.767	<0.010	62.885	<0.010	27.25	<0.010
Weibull	4.29	<0.010	1.187	<0.010	2.851	<0.010	1.15	<0.010
Weibull 3 parámetros	3.121	<0.005	1.227	<0.005	2.93	<0.005	0.967	0.01
Valor extremo mínimo	15.073	<0.010	4.419	<0.010	6.776	<0.010	3.572	<0.010
Valor extremo máximo	3.472	<0.010	2.574	<0.010	8.586	<0.010	1.779	<0.010
Gamma	3.152	<0.005	2.366	<0.005	5.802	<0.005	1.353	<0.005
Gamma 3 parámetros	2.718	*	1.163	*	1.846	*	1.259	*
Logística	6.094	<0.005	1.611	<0.005	1.25	<0.005	1.95	<0.005
Loglogística	2.969	<0.005	2.45	<0.005	2.387	<0.005	2.087	<0.005
Loglogística 3 parámetros	2.925	*	1.464	*	1.243	*	1.789	*
Transformación-Johnson	*	*	*	*	*	*	0.501	0.206
Poisson – Ji cuadrada	66.237	0.000	36.774	0.001	21.895	0.111	204.568	0.000
Prueba de signos-mediana	5	0.731	10	0.093	16	0.000	25	0.000
Rango de signos-Wilcoxon	13567.5	0.011	11205.0	0.222	6655.0	0.000	6452.0	0.000

Tabla 4.5. Pruebas estadísticas positivas a las concentraciones de 5, 10, 16 y 25 MP.

MP	Prueba Estadística Significativa	Valor p	Interpretación
5	Prueba de signos para la mediana	0.684	La mediana de la muestra es igual al valor de referencia
10	Prueba de signos para la mediana	0.095	La mediana de la muestra es igual al valor de referencia
16	Prueba de bondad de Ajuste de Poisson	0.207	Los datos se ajustan a una distribución uniforme de Poisson
25	Transformación de Johnson	0.206	Los datos se ajustan a una distribución normal después de la transformación de Johnson

El software ImageJ es una herramienta que proporciona resultados confiables para la cuantificación de MP fluorescentes en muestras líquidas. De las concentraciones analizadas, el método es confiable para concentraciones de hasta 16 MP. Los factores que pueden influir en los resultados de la cuantificación de MP son la superposición y aglomeración de los MP, su distribución en el volumen de la celda, las paredes de la celda, la calidad/ruido en la imagen, presencia de partículas no plásticas y por supuesto el valor

del *threshold*. En el caso de las concentraciones de 25 MP o superiores, el efecto de dichos factores se intensifica generando un incremento de la desviación de $\bar{x}$ respecto al valor real, así como un aumento considerable en σ . Esto conlleva a una mayor dispersión en los resultados, lo que afecta la precisión del método en condiciones de altas concentraciones de MP fluorescentes. Esta metodología destaca por su bajo costo y rapidez en comparación con otras técnicas analíticas más complejas, lo que la convierte en una opción viable para estudios a gran escala. Aún con la posibilidad de diversas interferencias presentes en la imagen, el método es robusto y permite obtener datos consistentes, especialmente cuando se aplican criterios estandarizados en su procesamiento previo. En este sentido, la aplicación de *threshold* fijo, como el valor 70, facilita la replicabilidad del análisis y reduce la subjetividad en la interpretación visual.

4.1.4 Discusión de resultados de la cuantificación de microplásticos utilizando el software ImageJ

La cuantificación de MP en muestras líquidas utilizando el software ImageJ representa una alternativa práctica y confiable para automatizar la cuantificación de MP en muestras líquidas eliminando la subjetividad inherente a las técnicas visuales y al criterio del analista. Esta herramienta demuestra ser confiable para concentraciones de hasta 16 MP, con una desviación estándar mínima entre la media obtenida y el valor real de 0.24, y una máxima de 1.51. La desviación estándar para las concentraciones de 5, 10 y 16 MP varía entre 3.12 y 3.88. Sin embargo, a partir de concentraciones de 25 MP, la herramienta disminuye su confiabilidad, para esta concentración la media puede desviarse hasta en 4 MP respecto al valor real y la desviación estándar alcanza los 6.93. Este aumento en la variabilidad en los resultados de la cuantificación de MP utilizando ImageJ se atribuye a factores como la aglomeración de partículas, la calidad de la imagen y ruido presente en la misma, que conduce a una sobreestimación de los MP. Por lo tanto, la concentración de MP es un factor determinante en la confiabilidad y exactitud de los resultados obtenidos con ImageJ.

El *threshold* es un parámetro determinante en la cuantificación de MP utilizando ImageJ, si sus valores no son los adecuados pueden omitir los MP y/o cuantificar falsos positivos generando resultados inexactos disminuyendo la confiabilidad del método. La intensidad de fluorescencia de los MP pudiese interferir en los resultados de la cuantificación utilizando el ImageJ, ya que los píxeles con valores inferiores al *threshold* seleccionado se omiten, por lo tanto, no se contabilizan los MP, por el contrario, los píxeles con valores superiores al *threshold* establecido pueden generar una sobreestimación de los MP.

La calidad de la imagen puede influir en los resultados obtenidos de la cuantificación de MP, los diversos factores que pueden afectar la calidad de la imagen son las condiciones establecidas para la adquisición de la imagen, cantidad de luz ambiental durante la toma de la imagen, y parámetros internos de la cámara utilizada, entre otros. Además, de esos factores, el tipo de cámara, resolución de la imagen y configuración de algunas herramientas específicas del software ImageJ también pueden afectar los resultados de la cuantificación de MP.

4.2 Detección de microplásticos utilizando el modelo CNN

4.2.1 Detección de microplásticos teñidos

Los resultados del modelo CNN de la detección de MP teñidos arrojan como salida los mapas de respuesta y estimación para determinar posteriormente probabilidad de la

presencia o ausencia de MP en la imagen, la presencia de MP se reporta con un valor numérico de 1, mientras que la ausencia se representa con un valor numérico de 0. En el caso de la detección de MP teñidos utilizando la cámara A, la lente circular y el filtro naranja, los resultados muestran que el modelo CNN detecta específicamente los MP teñidos en las imágenes, logrando diferenciar la presencia, 1, o ausencia, 0, de estos, sin que la concentración de MP teñidos sea un factor que pueda interferir en los resultados de la detección.

En la Fig. 4.9 a) se muestran algunos mapas de respuesta que se obtienen en las diversas capas convolucionales y en la Fig. 4.9 b) y c) los mapas de estimación que se utilizan para la detección de MP teñidos. En los mapas de estimación es donde se calcula la probabilidad de la presencia de los MP teñidos contenidos en la imagen, además, en ellos se logra diferenciar los MP teñidos de otras características presentes en la imagen como burbujas, las paredes de la celda o ruido de la imagen.

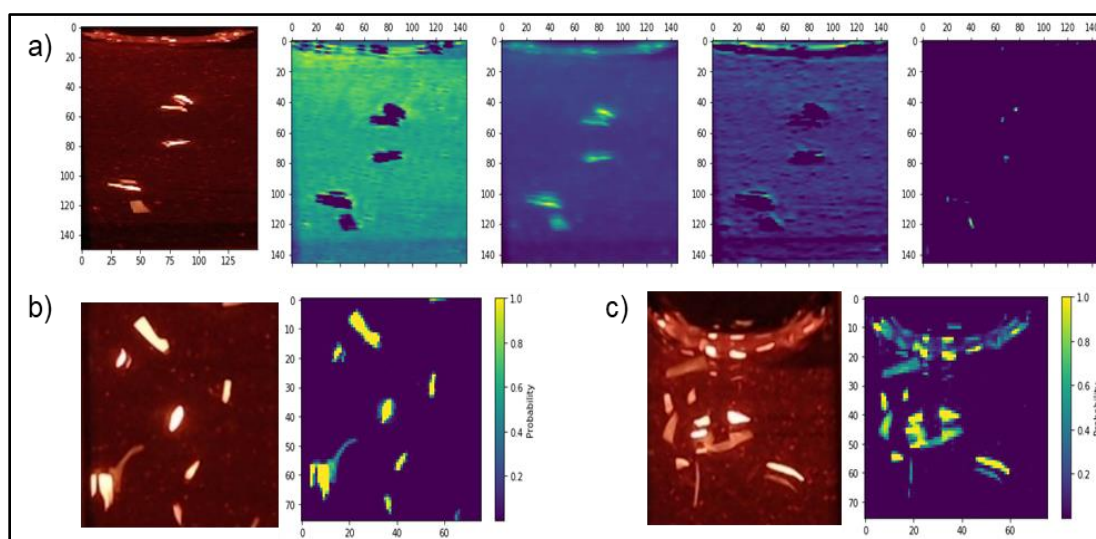


Fig. 4.9 Mapas de respuesta y mapas de estimación para la detección de MP teñidos para a) 5 MP, b) 10 MP y c) 16 MP respectivamente.

En la detección de MP teñidos utilizando el modelo CNN, se analizaron 1,800 imágenes de agua HPLC y 1,800 imágenes con concentraciones conocidas de MP teñidos 5, 10, 16, 20, 25, 30, 40 y 45. Las imágenes de agua HPLC se utilizaron para evaluar la capacidad del modelo CNN para identificar correctamente la ausencia de las partículas de interés. El modelo CNN mostró ser confiable para la detección de MP tanto en imágenes sin MP como en aquellas con concentraciones conocidas de MP teñidos. En la Fig. 4.10 se muestran los resultados obtenidos en cada imagen analizada, la dispersión de los datos es mayor en las imágenes de agua HPLC que en aquellas que contienen MP teñidos, lo que indica según el tratamiento recibido, el modelo CNN detecta con mayor facilidad la presencia de MP que su ausencia.

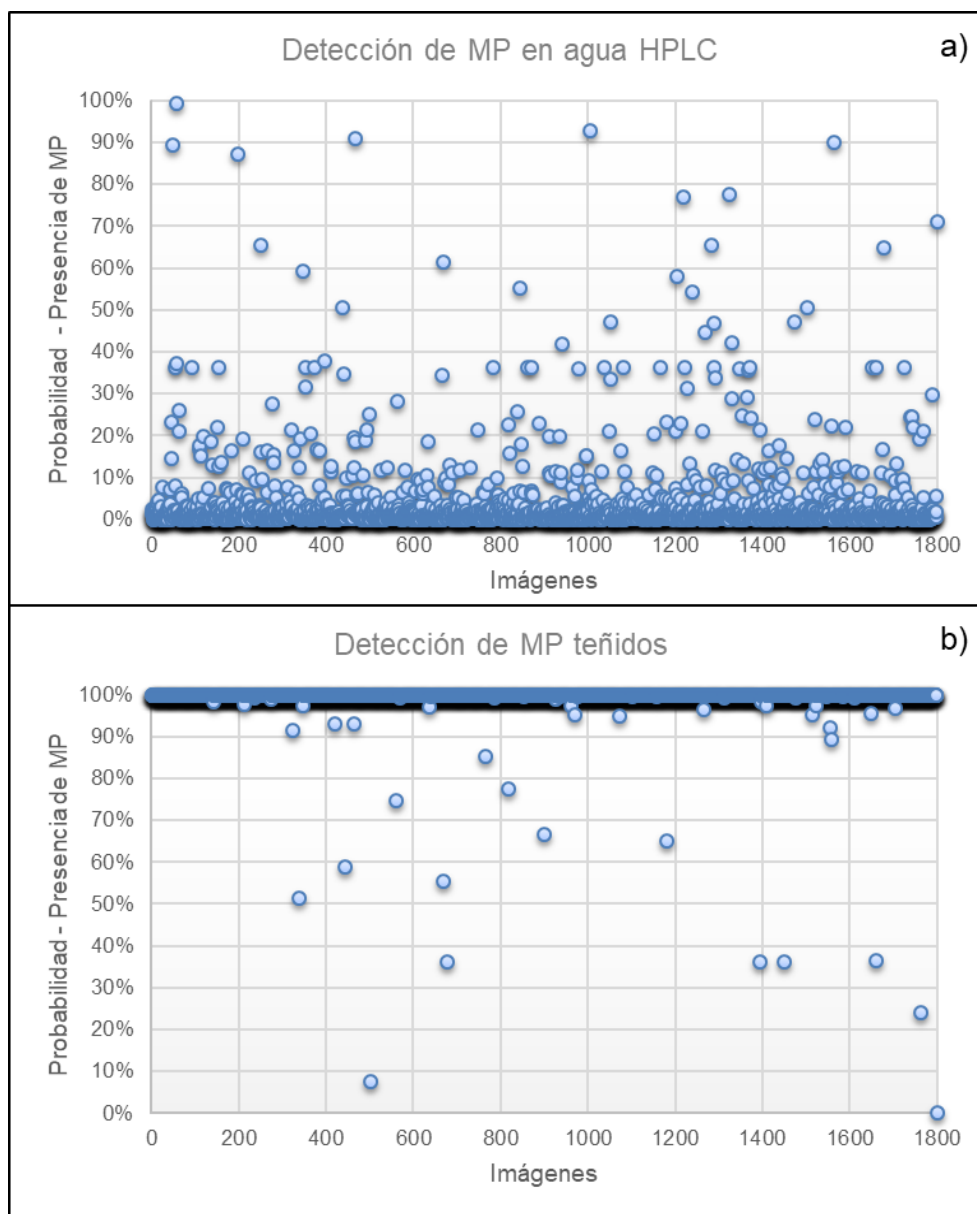


Fig. 4.10 Detección de MP en a) agua HPLC y b) MP teñidos.

Las métricas de desempeño del modelo CNN para la detección de MP indican precisión del 99.09%, exactitud de 99.35%, sensibilidad de 99.61% y especificidad del 99.08%, ver Fig. 4.11, lo que indica que el modelo CNN desarrollado es altamente confiable para la detección de MP teñidos en muestras líquidas.

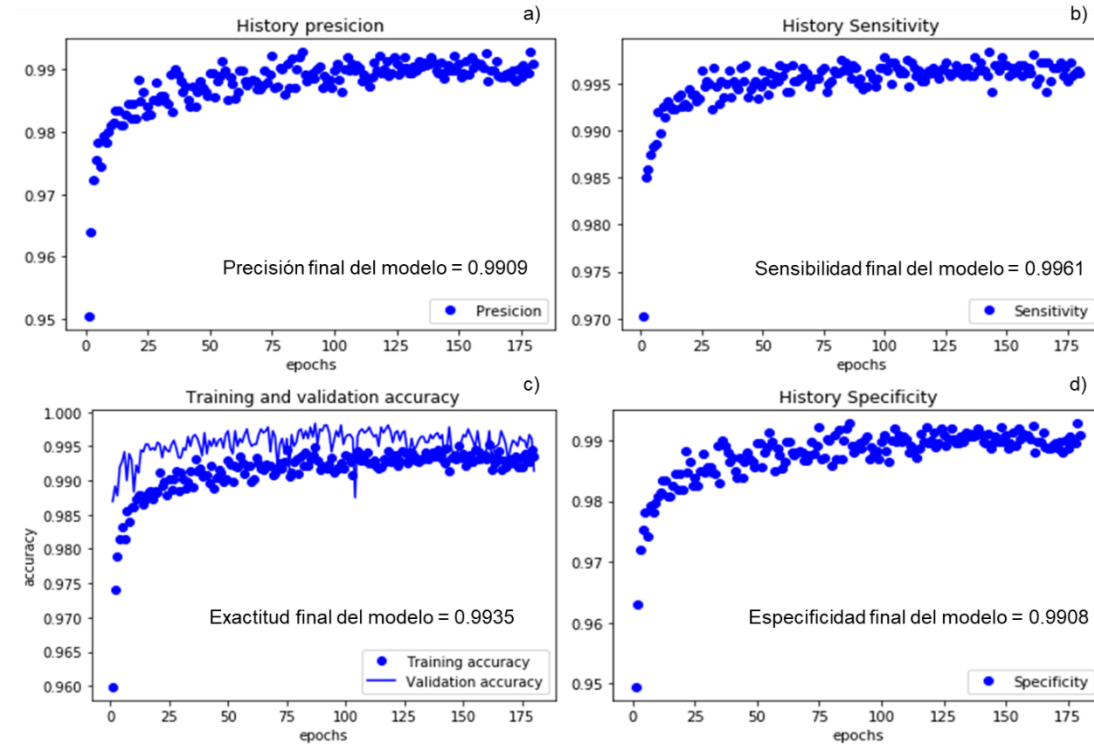


Fig. 4.11 Métricas de desempeño del modelo CNN para la detección de MP teñidos: a) precisión, b) sensibilidad, c) exactitud y d) especificidad.

4.2.2 Detección de microplásticos sin teñir

Los resultados del modelo CNN de la detección de MP sin teñir arrojan como salida los mapas de respuesta y estimación para determinar la probabilidad de la presencia o ausencia de MP en la imagen. La presencia de MP se reporta con un valor numérico de 1, mientras que la ausencia se representa con un valor numérico de 0. En el caso de la detección de MP sin teñir las imágenes se tomaron utilizando la cámara B, la lente circular y filtro polarizador, los resultados muestran que el modelo CNN tiene la capacidad de detectar específicamente los MP sin teñir en las imágenes, logrando diferenciar la presencia o ausencia, sin que la concentración y el uso de una cámara diferente sean factores que pudieran interferir en los resultados de la detección.

Algunos de los mapas de respuesta y estimación obtenidos con el modelo CNN para la detección de MP sin teñir con concentraciones de 16 y 25 MP se muestran en la Fig. 4.12. Los resultados obtenidos indican que la tinción no interfiere en la detección de MP, sin embargo, resulta más fácil para el modelo CNN detectar la presencia de MP teñidos que sin teñir en la imagen, lo anterior de acuerdo con los resultados mostrados en la Fig. 4.13.

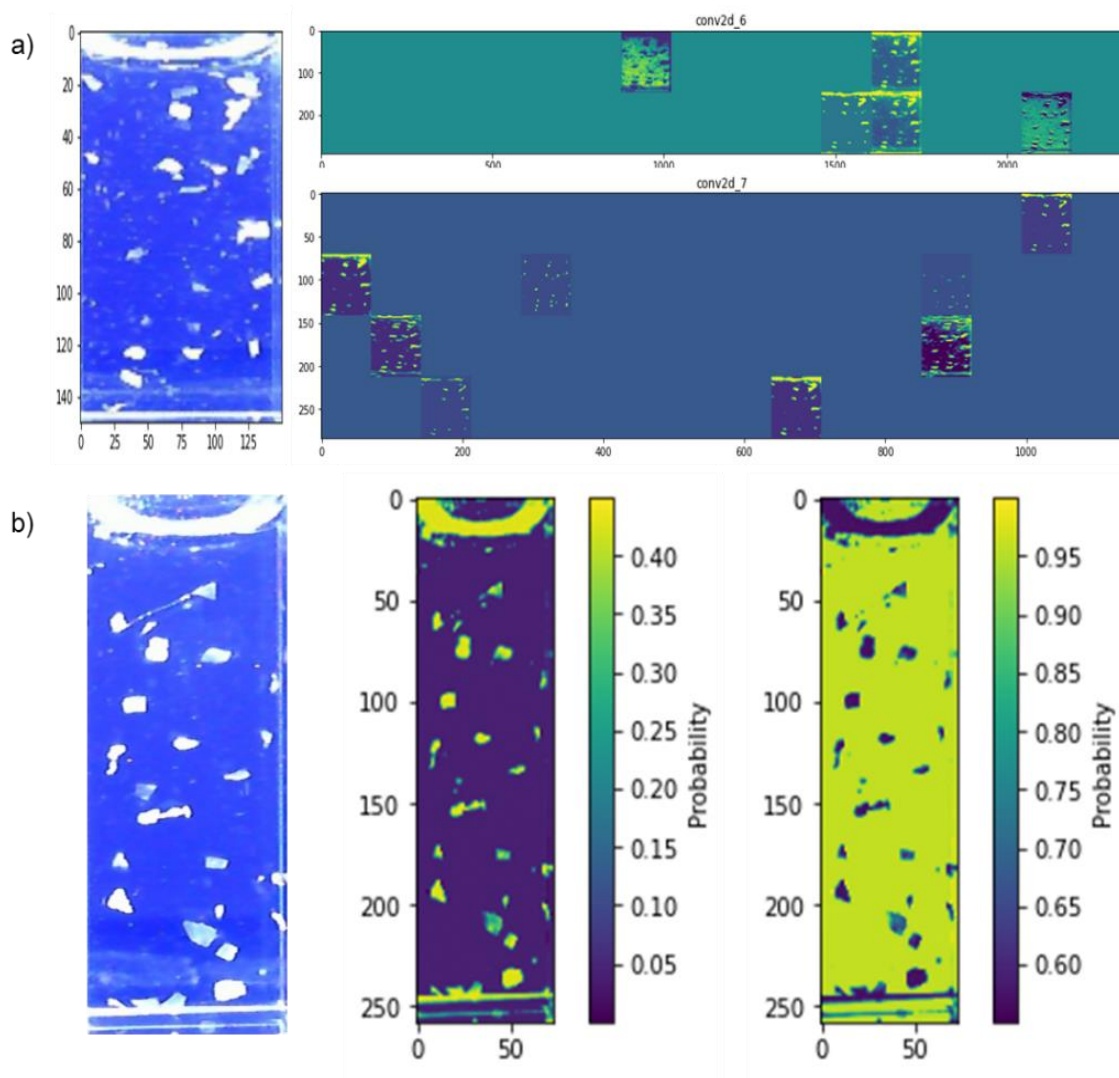


Fig. 4.12 Mapas de respuesta y de estimación para la detección de MP sin teñir, a) 16 MP y b) 25 MP.

Para realizar la detección de MP sin teñir utilizando el modelo CNN, se analizaron 1,800 imágenes de agua HPLC y 1,800 imágenes con concentraciones conocidas de MP sin teñir 5, 10, 16, 20, 25, 30, 40 y 45. El modelo CNN es confiable para la detección de MP sin teñir tanto en imágenes sin MP como en aquellas con concentraciones conocidas de MP. En la Fig. 4.13 se muestran los resultados obtenidos en cada imagen analizada, se observa que la dispersión de los datos es mayor en las imágenes de los MP sin teñir que en las del agua HPLC, es decir, el modelo CNN detecta con mayor facilidad la ausencia de MP que su presencia.

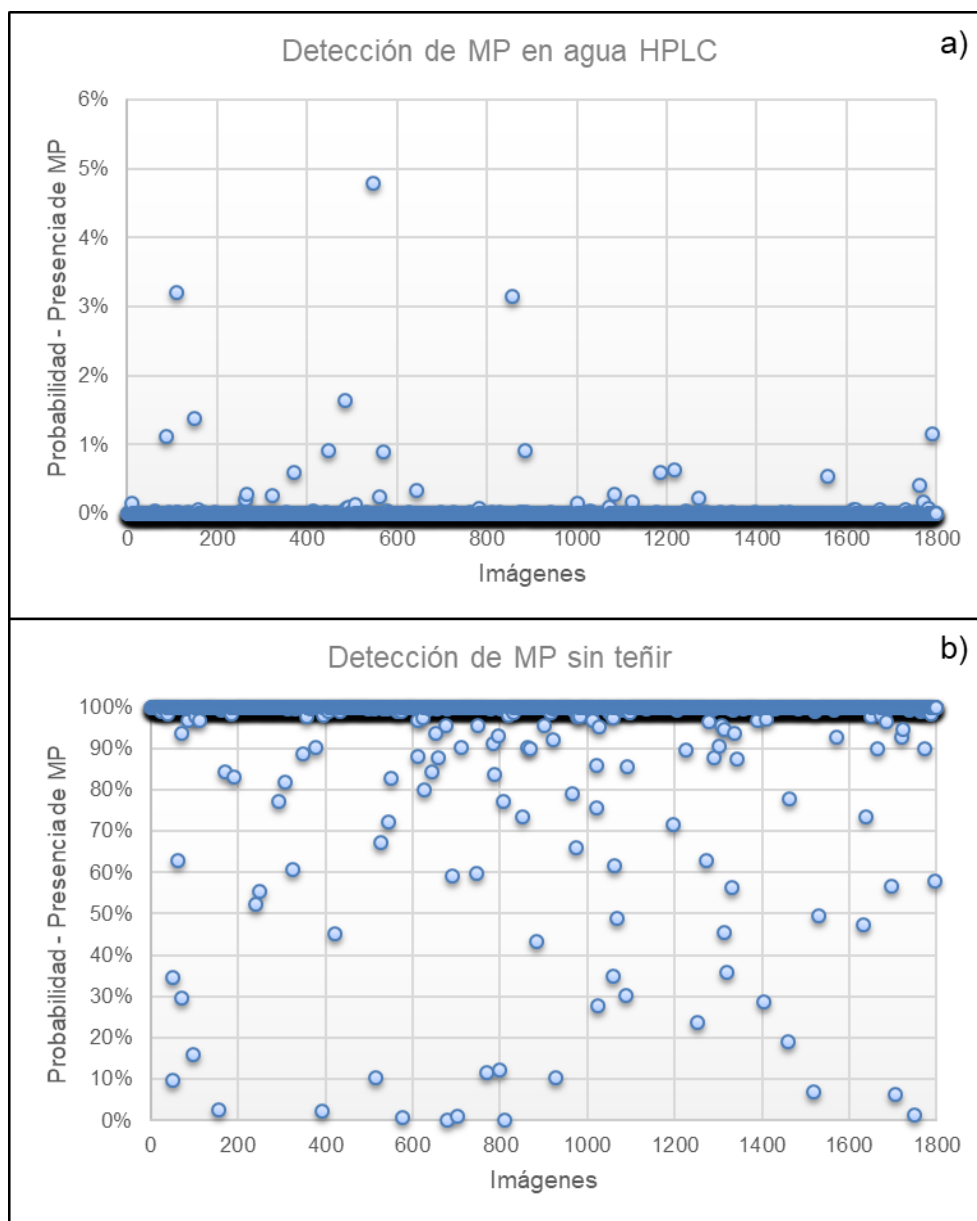


Fig. 4.13 Detección de MP en a) agua HPLC y b) MP sin teñir.

Las métricas de desempeño del modelo CNN para la detección de MP sin teñir, muestran precisión del 99.17%, exactitud del 99.35%, sensibilidad de 99.58% y especificidad de 99.08%, ver Fig. 4.14, demostrando que el modelo CNN desarrollado es confiable para la detección de MP sin teñir diferenciándolos de otras características que pudiesen interferir en los resultados como otro tipo de partículas, las paredes de la celda, reflejos de los MP y ruido en la imagen. Al igual que en la detección de MP teñidos, la concentración tampoco interfiere en los resultados obtenidos utilizando el modelo CNN. Además, es importante mencionar que se utilizó una cámara diferente para la adquisición de las imágenes sin que esto origine interferencia alguna en la confiabilidad del modelo CNN ni en los resultados de la detección de MP sin teñir.

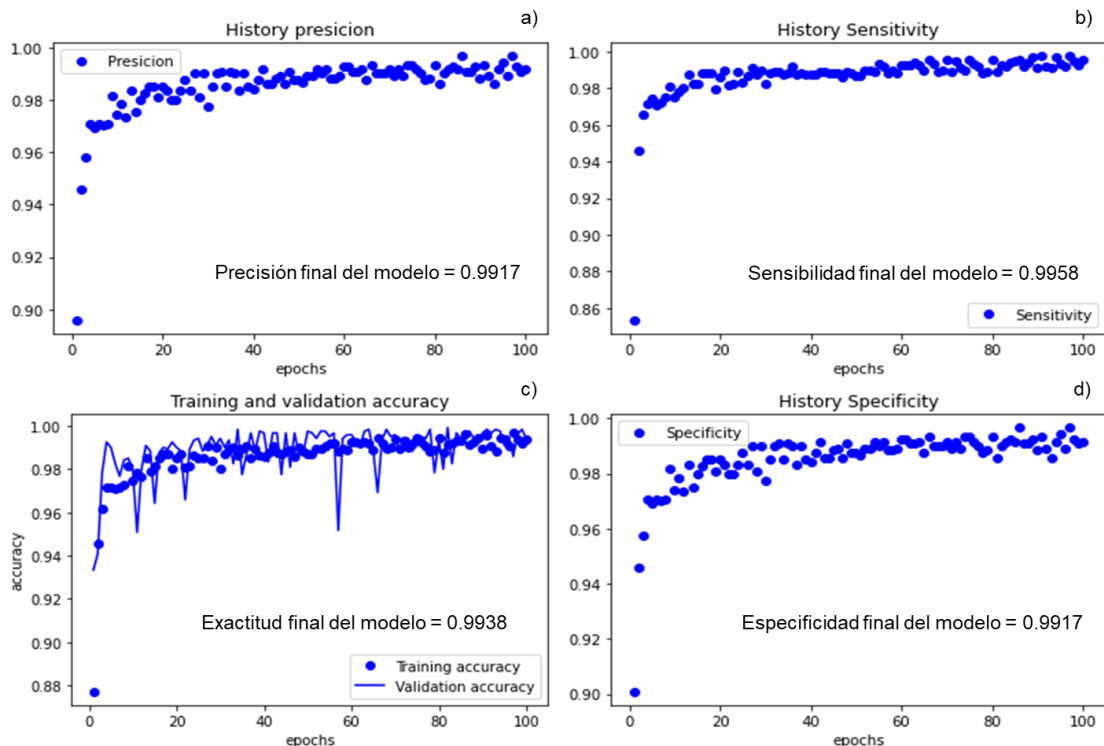


Fig. 4.14 Métricas de desempeño del modelo CNN para la detección de MP sin tñir: a) precisión, b) sensibilidad, c) exactitud y d) especificidad.

4.2.3 Detección de microplásticos en mezclas con materiales no plásticos

El modelo CNN desarrollado y entrenado utilizando imágenes de MP teñidos y sin tñir, se utilizó para analizar imágenes de muestras líquidas que contienen materiales no plásticos como: arena, fibra de vidrio, gis (CaCO_3), naturaleza muerta, madera, $(\text{C}_6\text{H}_{10}\text{O}_5)_n$ comercialmente maicena y MDF, y una mezcla de los materiales no plásticos con MP de concentraciones conocidas de 3, 5 y 10. Estas imágenes fueron tomadas con la cámara B, la lente circular y ambos filtros. Los MP utilizados en esta etapa son teñidos y sin tñir tomando 50 imágenes de cada solución preparada de materiales no plásticos y mezclas con concentración conocida de MP.

Los resultados obtenidos de la detección de MP utilizando el modelo CNN en las imágenes de los materiales no plásticos y las mezclas de ellos con 3, 5 y 10 MP se muestran en la Tabla 4.6, donde se observa cierta variabilidad en la detección, tanto para los materiales no plásticos sin tñir como teñidos, es decir, el modelo CNN reporta falsos positivos para las soluciones preparadas con fibra de vidrio, naturaleza muerta, madera y MDF. Por lo anterior, se identifica la necesidad de reentrenar el modelo CNN para que aprenda las características de los materiales no plásticos teñidos y sin tñir.

El modelo CNN se reentrenó con 50 imágenes de cada uno de los materiales no plásticos y sus mezclas con MP, cuyo resultados indican que el modelo CNN es confiable de acuerdo con la teoría del 50%, aceptable en las redes neuronales convolucionales, los resultados de la presencia, 1, o ausencia, 0, se muestran en la Tabla 4.6; para los materiales no plásticos, los valores para la ausencia de MP son cercanos a cero, mientras que los valores para las muestras de mezclas de MP con materiales no plásticos superan el 0.5 y se

acercan a 1, lo que es aceptable en los modelos CNN. Por lo tanto, el reentrenamiento del modelo considera las nuevas características presentes en las imágenes de los materiales no plásticos, obteniendo una mejora en la detección de MP con respecto al modelo CNN original. Por otro lado, los resultados del modelo CNN original y reentrenado para las mezclas de materiales no plásticos con concentración conocida de MP, tanto teñidos como sin teñir, son confiables, indicando que ambos modelos son capaces de detectar la presencia de MP teñidos y sin teñir aun con la presencia de materia orgánica no plástica.

Tabla 4.6. Detección de MP con el modelo CNN original con respecto al modelo CNN reentrenado.

Modelo CNN original			Modelo CNN reentrenado		
Presencia o ausencia de MP			Presencia o ausencia de MP		
Materiales no plásticos puros	Sin Teñir	Teñidos	Materiales no plásticos puros	Sin Teñir	Teñidos
Arena	0.1182	0.2977	Arena	0.0092	0.0000
Fibra de Vidrio	0.4973	0.5796	Fibra de Vidrio	0.0088	0.0002
CaCO ₃ 250um-A	0.0813	0.2882	CaCO ₃ 250um-A	0.0018	0.0133
CaCO ₃ 250um-B	0.1006	0.3666	CaCO ₃ 250um-B	0.0248	0.0000
CaCO ₃ 500um	0.0391	0.4248	CaCO ₃ 500um	0.0005	0.0000
CaCO ₃ polvo	0.0301	0.1456	CaCO ₃ polvo	0.0000	0.0001
Naturaleza Muerta	0.5420	0.7858	Naturaleza Muerta	0.0792	0.0675
Madera	0.7516	0.8286	Madera	0.0176	0.2199
(C ₆ H ₁₀ O ₅) _n	0.0395	0.2231	(C ₆ H ₁₀ O ₅) _n	0.0000	0.0001
MDF	0.4916	0.6627	MDF	0.0164	0.0783
Materiales no plásticos + MP	Sin Teñir	Teñidos	Materiales no plásticos + MP	Sin Teñir	Teñidos
Mezcla 1 3MP	0.7335	0.9586	Mezcla 1 3MP	0.6135	0.9031
Mezcla 2 5 MP	0.8912	1.0000	Mezcla 2 5 MP	0.8605	0.9211
Mezcla 3 10 MP	0.8301	1.0000	Mezcla 3 10 MP	0.6989	0.9685

Las métricas de desempeño del modelo CNN reentrenado se muestran en la Tabla 4.7, donde la precisión alcanzada para la detección de MP sin teñir es de 0.9868, mientras que para MP teñidos se incrementa a 0.9949, lo que indica que los resultados obtenidos son confiables una vez que el modelo CNN ha sido reentrenado. Además, estas métricas de desempeño indican que la precisión y exactitud de modelo CNN reentrenado son mayores para las soluciones con MP teñidos, sin embargo, la diferencia no es significativa, lo que muestra que el modelo CNN reentrenado elimina los falsos positivos de los materiales no plásticos y logra diferenciar los MP teñidos y sin teñir en mezclas con materiales no plásticos. Es importante mencionar que la tinción no es un factor que interfiera en la confiabilidad de los resultados del modelo CNN para detección de MP, sin embargo, el modelo tiene mayor sensibilidad para detectar la presencia o ausencia de MP teñidos.

Tabla 4.7. Métricas de desempeño del modelo CNN para la detección de MP mezclados con materiales no plásticos.

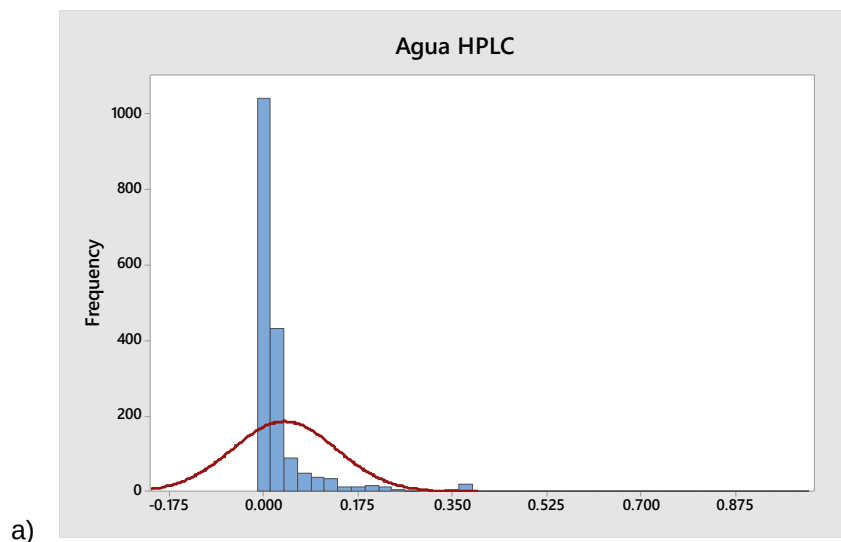
	Mezclas con MP sin Teñir	Mezclas con MP Teñidos
Precisión	0.9868	0.9949
Sensibilidad	0.9933	0.9925
Especificidad	0.9867	0.9950
Exactitud	0.9900	0.9938

Por lo tanto, se requiere que el modelo CNN sea reentrenado cada vez que se incluyan nuevas variables o materiales a las muestras de estudio, para asegurar su confiabilidad, precisión y exactitud. Lo anterior para que el modelo CNN obtenga la información necesaria de las nuevas características presentes y que los resultados sean confiables, disminuyendo la posibilidad de falsos positivos y sesgos en los resultados de la detección de MP.

4.2.4 Análisis estadístico de la detección de microplásticos

Los resultados obtenidos de la detección de MP en soluciones con MP teñidos y sin teñir, así como en las mezclas de materiales no plásticos con concentración conocida de MP son cero para la ausencia y uno para la presencia de MP, fueron analizados estadísticamente, obteniendo los parámetros descriptivos básicos y la prueba de Anderson-Darling con un intervalo de confianza del 95%.

Las gráficas de distribución de frecuencias indican que la dispersión de los datos es mayor en las soluciones de agua HPLC cuando se utilizan las muestras teñidas y en las muestras de MP sin teñir con concentración conocida, ver Fig. 4.15 a) y d), mientras que la distribución de frecuencias para las muestras de MP teñidos con concentración conocida y agua HPLC en muestras sin teñir, indican que la dispersión en los datos es mínima, ver Fig. 4.15 b) y c). Para las mezclas de materiales no plásticos con concentración conocida de MP, las gráficas de distribución de frecuencia indican que la dispersión de los datos es mayor en las muestras sin teñir con respecto a las muestras teñidas, ver Fig. 4.16.



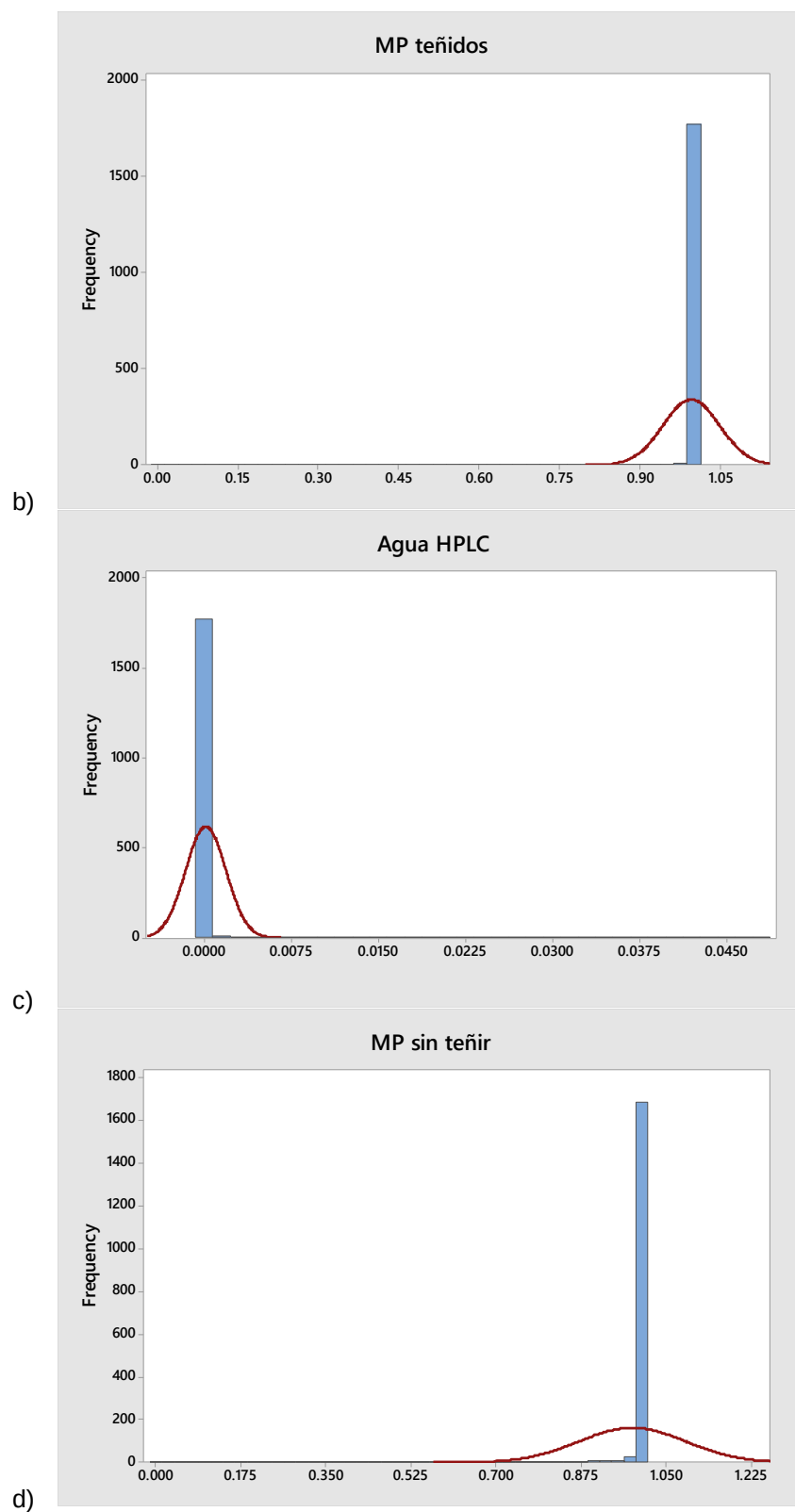
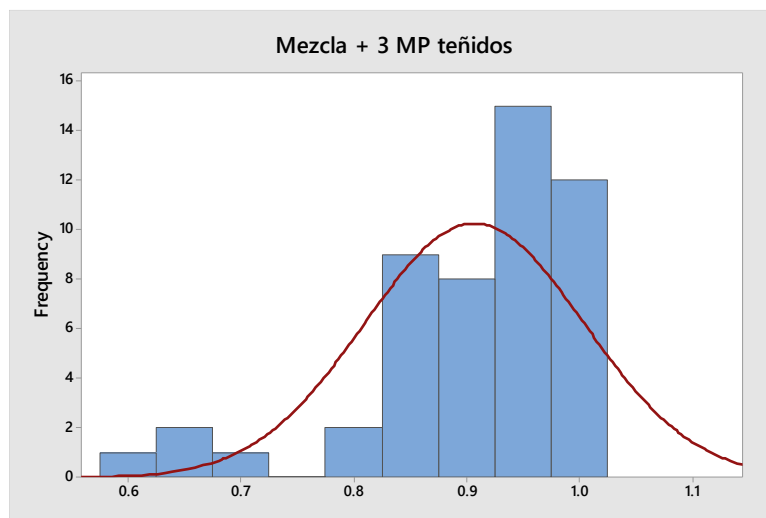
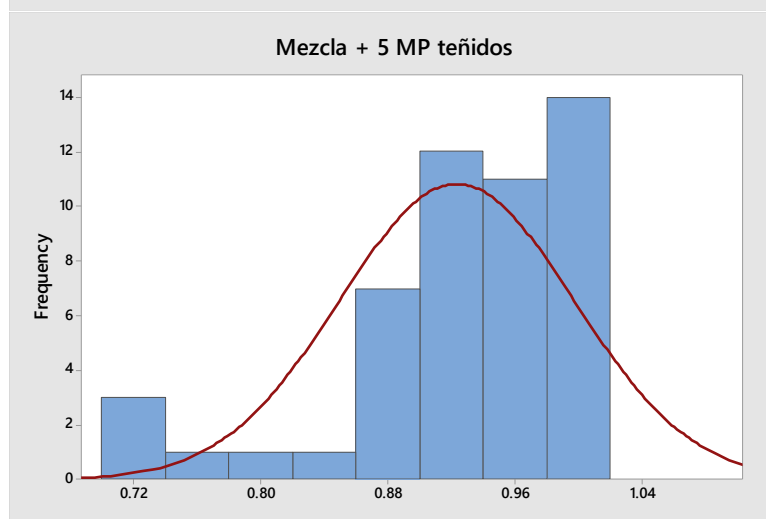


Fig. 4.15 Distribución de frecuencias de los resultados de la detección de MP, a) agua HPLC, solución de tintura, b) MP teñidos, c) agua HPLC y d) MP sin teñir.

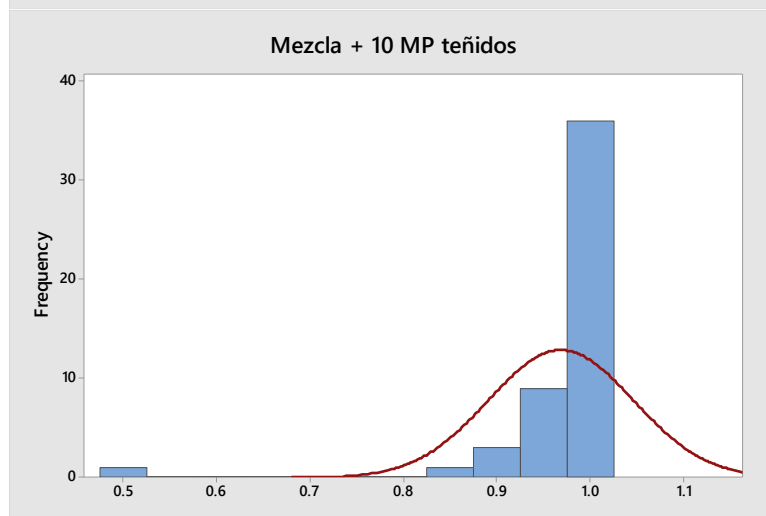
a)



b)



c)



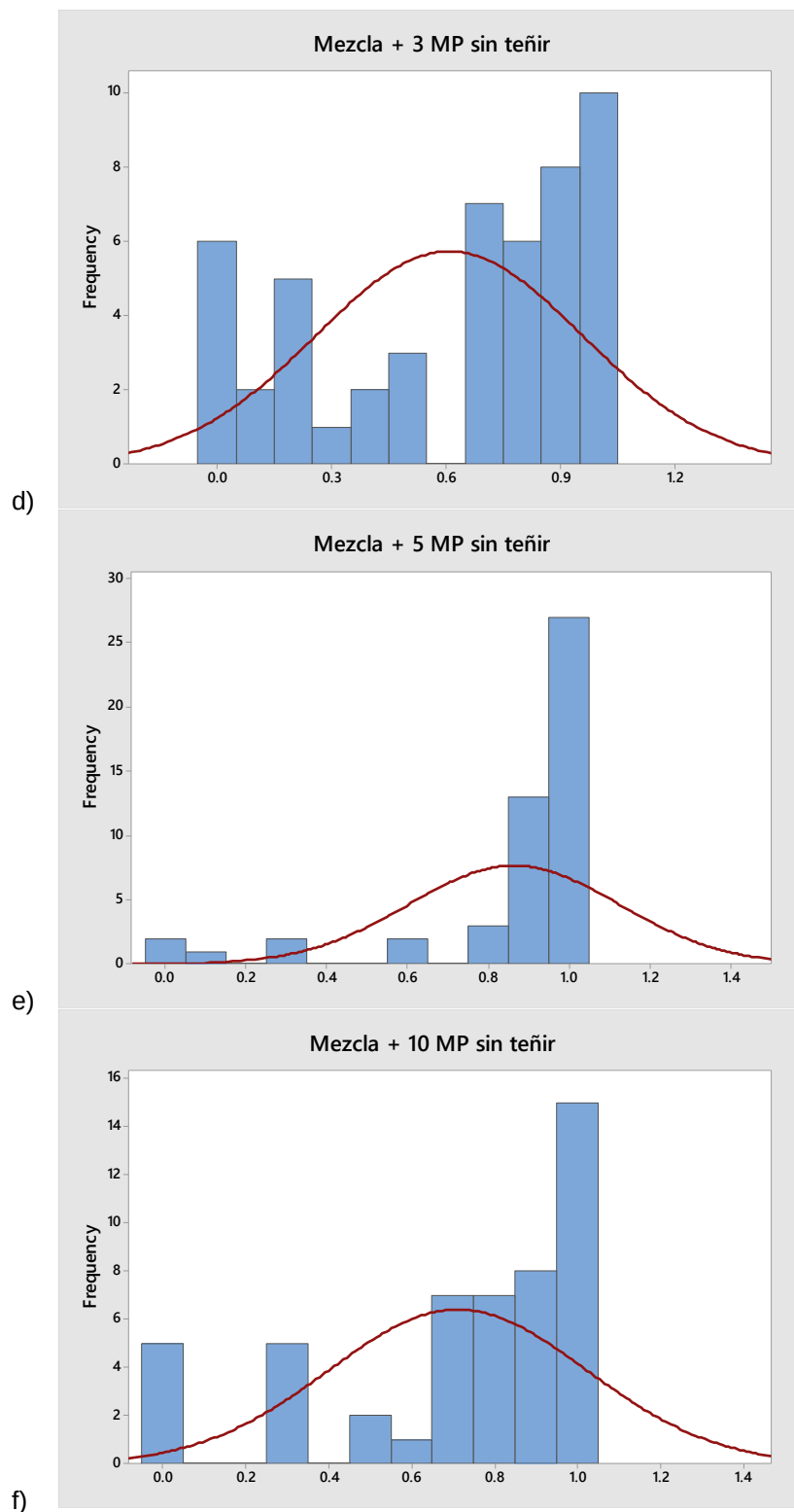


Fig. 4.16 Distribución de frecuencias de los resultados de la detección de MP en las mezclas de materiales no plásticos con concentración conocida de MP, a) 3 MP teñidos, b) 5 MP teñidos, c) 10 MP teñidos, d) 3 MP sin teñir, e) 5 MP sin teñir y f) 10 MP sin teñir.

Los resultados del análisis estadístico indican que los valores de la $\bar{x}$ y σ de la detección de MP en las imágenes analizadas utilizando diferentes cámaras, muestras teñidas y sin teñir, así como materiales no plásticos y mezclas de materiales no plásticos con concentración conocida de MP no presentan variación significativa, por consiguiente, no son factores que interfieran en la confiabilidad del modelo CNN para la detección de MP. La mayor variabilidad de $\bar{x}$ se presenta en las mezclas de materiales no plásticos con concentración conocida de MP sin teñir, especialmente en la concentración menor que corresponde a 3 MP, mientras que la mayor σ corresponde a la misma serie de imágenes, en general las mezclas de materiales no plásticos con concentración conocida de MP sin teñir son las que obtienen los valores mayores de σ sin que estos superen el valor de 0.4 por lo que estadísticamente demuestran que aun cuando exista dispersión de los datos esta es mínima. Los valores de $\bar{x}$ y σ para cada serie de imágenes se muestran en la Tabla 4.8, indican que el modelo CNN es confiable y exacto para la detección de los MP en las diversas condiciones de la adquisición de las imágenes y de la preparación de las muestras.

Tabla 4.8. Análisis estadístico de la detección de MP utilizando el modelo CNN.

Variable	$\bar{x}$	σ	Varianza	Mediana	Moda
Agua HPLC	0.0384	0.0966	0.0093	0.0093	0.3630
MP teñidos	0.9951	0.0529	0.0028	1.0000	1.0000
Agua HPLC	0.0001	0.0017	0.0000	0.0000	0.0000
MP sin teñir	0.9801	0.1104	0.0122	1.0000	1.0000
Mezcla + 3 MP teñidos	0.9069	0.0973	0.0095	0.9402	1.0000
Mezcla + 5 MP teñidos	0.9235	0.0737	0.0054	0.9380	*
Mezcla + 10 MP teñidos	0.9685	0.0776	0.0060	0.9899	*
Mezcla + 3 MP sin teñir	0.6085	0.3482	0.1212	0.7218	*
Mezcla + 5 MP sin teñir	0.8629	0.2604	0.0678	0.9682	*
Mezcla + 10 MP sin teñir	0.7114	0.3115	0.0970	0.8177	*

Por lo tanto, los resultados indican que, factores como la concentración y tipo de cámara utilizado para la toma de imágenes no influyen en la confiabilidad del modelo CNN para la detección de MP ya que no generan incrementos significativos en la dispersión de los datos. Sin embargo, es importante mencionar que el modelo CNN es más sensible a detectar MP en las mezclas de materiales no plásticos con MP teñidos que sin teñir.

4.2.5 Discusión de resultados de la detección de microplásticos utilizando el modelo CNN

El modelo CNN para de detección de MP demostró ser una técnica confiable, es capaz de considerar las diversas características presentes en la imagen y que pusiesen afectar los resultados, tales como la aglomeración y precipitación de los MP, reflejos generados en la imagen, burbujas y ruido de la imagen, entre otros. El modelo CNN requiere ser reentrenado ante el cambio de variables significativas como el tipo de polímero, tipo de

celda, calidad de la imagen o concentraciones distintas a las previamente analizadas. El modelo CNN también demostró ser más sensible a detectar MP teñidos que sin teñir sin que esto pueda afectar su confiabilidad.

4.3 Cuantificación de microplásticos utilizando el modelo CNN

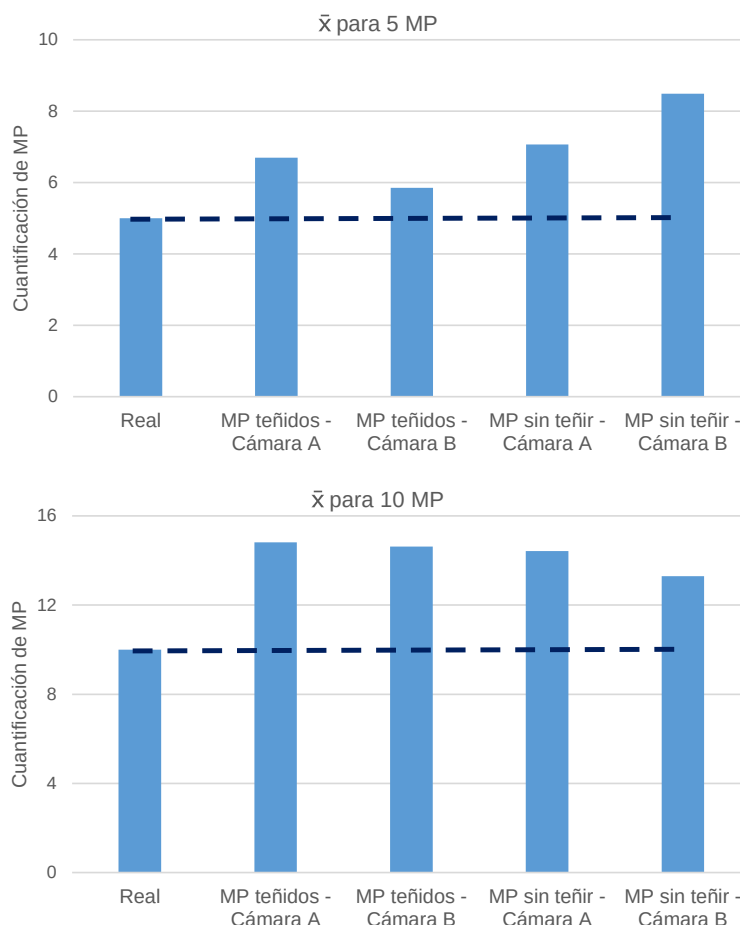
El entrenamiento, validación y evaluación del modelo CNN se realizó con imágenes adquiridas con las cámaras A, B y C, los dos tipos de lentes y los dos tipos de filtros, el modelo fue entrenado inicialmente con imágenes de soluciones de MP teñidos tomadas con la cámara A, después con imágenes de soluciones que contienen MP sin teñir tomadas con la cámara B y, finalmente, con las imágenes de mezclas de materiales no plásticos con concentración conocida de MP, con la cámara B. Estas fases de reentrenamiento fueron fundamentales para robustecer el modelo CNN aprendiendo a identificar las características presentes en la imagen que pudiesen influir en los resultados. Con lo anterior se logra obtener un modelo CNN robusto que pueda ser utilizado para la cuantificación de MP sin que la tinción, concentración de MP, resolución, calidad o ruido en la imagen sean factores que influyan en los resultados de la cuantificación de MP. Por lo tanto, la cuantificación de MP se realizó en diferentes fases para validar que el modelo CNN se ha robustecido una vez que ha sido reentrenado, permitiendo así que los resultados obtenidos sean confiables, ver Tabla 4.9, donde se muestran las variables utilizadas para cada fase del robustecimiento del modelo CNN.

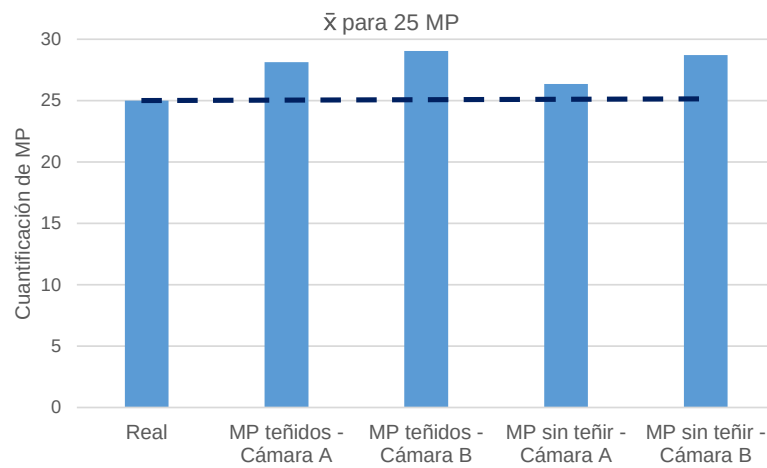
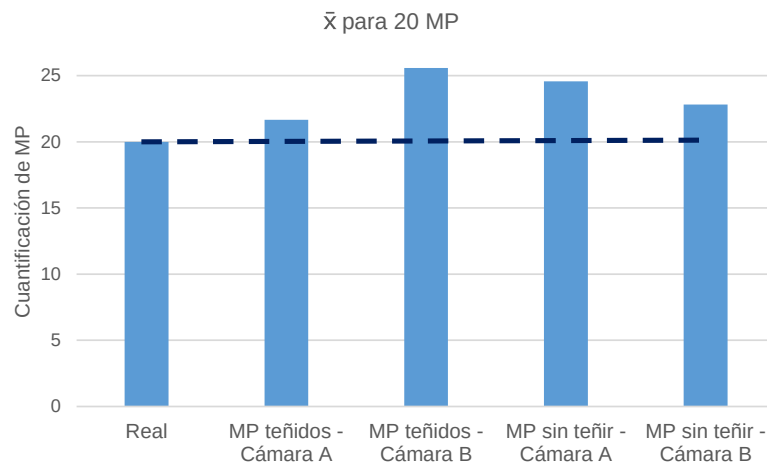
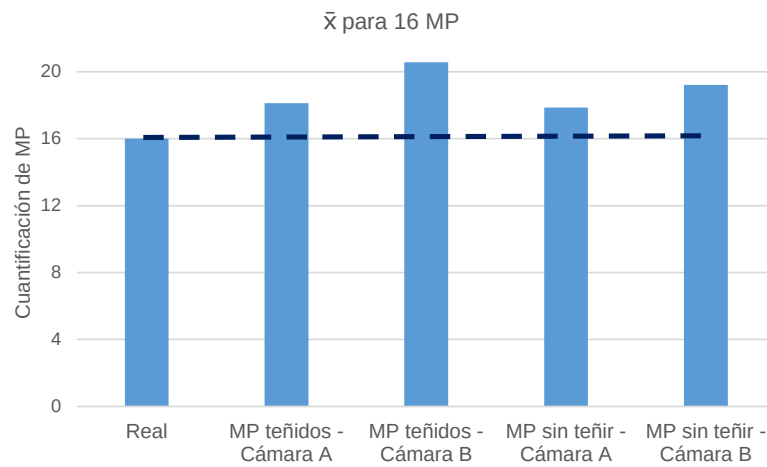
Tabla 4.9. Fases del robustecimiento del modelo CNN para la cuantificación de MP.

Fase	Muestra	Componentes del sistema para la adquisición de imágenes
1	Agua HPLC MP teñidos	Cámara A Lente circular Filtro naranja
2	Agua HPLC MP sin teñir	Cámara A Lente circular Filtro polarizador
3	Agua HPLC MP teñidos	Cámara B Lente circular Filtro naranja
4	Agua HPLC MP sin teñir	Cámara B Lente circular Filtro polarizador
5	Agua HPLC MP teñidos/sin teñir Mezclas de materiales no plásticos con MP teñidos y sin teñir.	Cámara A y B Lente circular y objetivo 40x Filtro naranja y polarizador
6	Reentrenamiento Agua HPLC MP teñidos/sin teñir Mezclas de materiales no plásticos con MP teñidos y sin teñir.	Cámara A y B Lente circular y objetivo 40x Filtro naranja y polarizador
7	Evaluación global Agua HPLC MP teñidos MP sin teñir Mezclas de materiales no plásticos con MP teñidos y sin teñir.	Cámara C Lente objetivo 40x Filtro naranja y polarizador

4.3.1 Cuantificación de microplásticos teñidos y sin teñir

Los valores de la concentración promedio de los resultados de la cuantificación de MP teñidos y sin teñir utilizando el modelo CNN con las imágenes tomadas con las cámaras A y B, se presentan en la Fig. 4.17 de forma acumulada para cada una de las concentraciones analizadas con respecto al valor real. Estos gráficos muestran que para 5 MP, la mayor variabilidad se presenta para la combinación de MP sin teñir y cámara B, con una desviación de 3 MP con respecto al valor real, mientras que para la concentración de 10 MP la variabilidad que presentan los resultados es de entre 3 y 5 MP en las 4 combinaciones de las variables utilizadas para la adquisición de las imágenes. Para la concentración de 16 MP, los MP teñidos y cámara B son los que presentan la mayor variabilidad con 5 MP por encima del valor real. Para la concentración de 20 MP los MP teñidos y cámara B, así como los MP sin teñir con cámara A, muestran una variabilidad de 6 y 5 MP respectivamente con respecto al valor real. Para la concentración de 25 MP los MP teñidos y sin teñir y cámara B muestran una variabilidad de 4 MP por encima del valor real. Para la concentración de 30 MP las muestras con MP teñidos y cámara B muestran la mayor variabilidad con hasta 5 MP por encima del real. Por otro lado, los resultados para la concentración de 40 MP es exacta para las 4 combinaciones de variables utilizadas en la toma de imágenes. Finalmente, la concentración de 45 MP tiene su mayor variabilidad en los MP sin teñir y cámara B con 5 MP por debajo del valor real. Los resultados obtenidos se analizaron estadísticamente para validar que el modelo CNN es una alternativa confiable para la cuantificación de MP en muestras líquidas, ver Tabla 4.10.





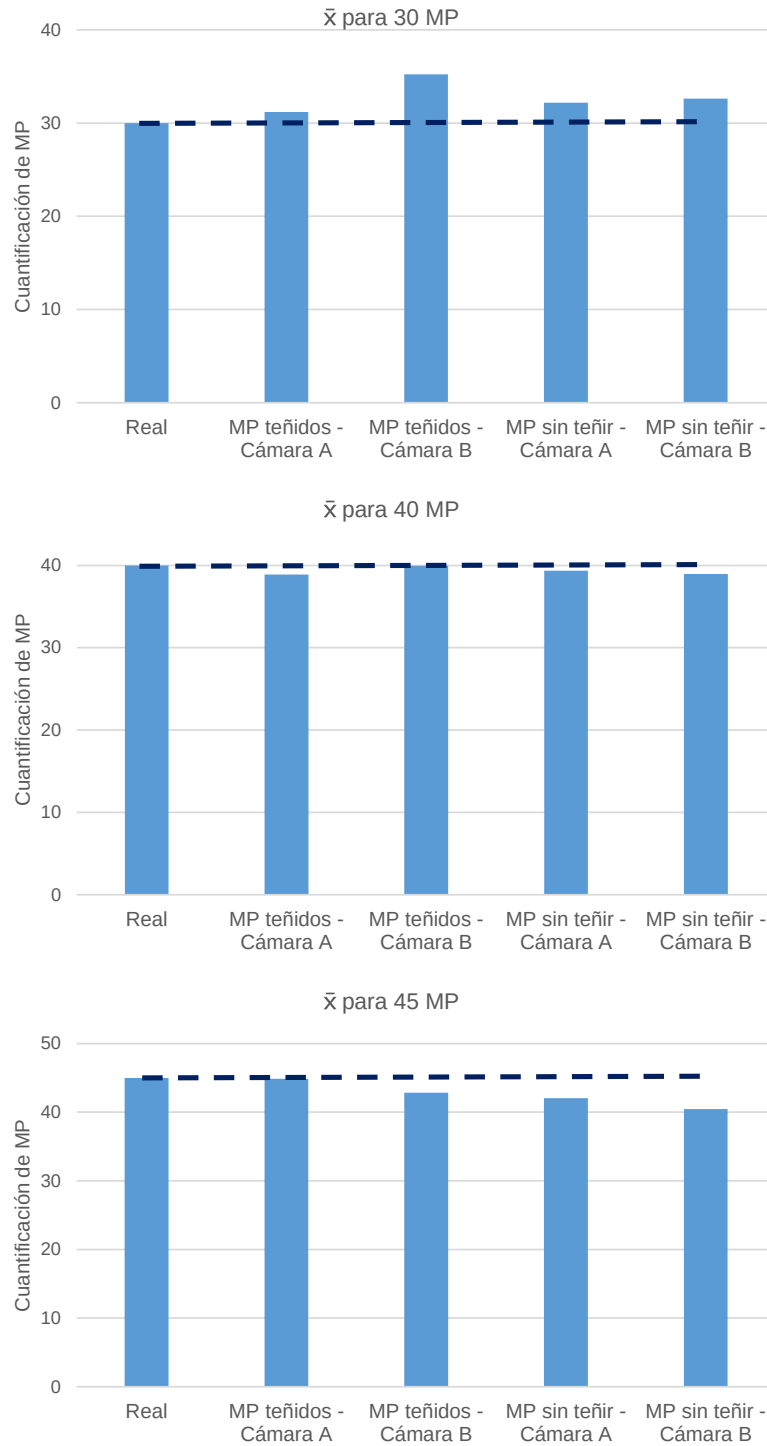


Fig. 4.17 Concentración promedio de MP teñidos y sin teñir, cámara A y B, cuantificación de MP utilizando el modelo CNN.

Tabla 4.10. Cuantificación de MP con el modelo CNN y su análisis estadístico.

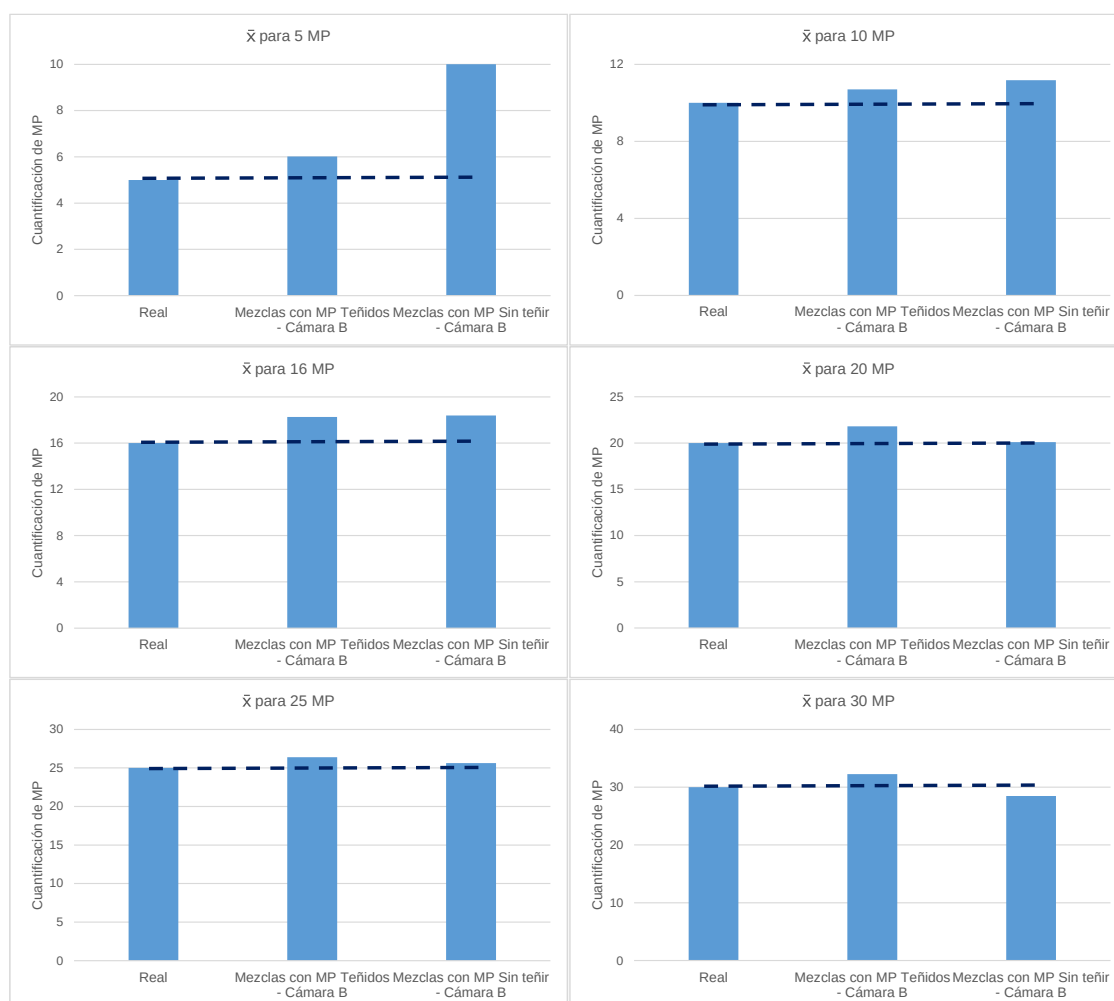
		MP Teñidos - Cámara A				MP Sin teñir - Cámara A				
		Modelo CNN		Minitab		Modelo CNN		Minitab		
[MP]	Cantidad Imágenes	$\bar{x}$	Error	$\bar{x}$	σ	Cantidad Imágenes	$\bar{x}$	Error	$\bar{x}$	σ
5	250	6.7362	1.7362	6.6961	0.9886	250	7.0649	2.0649	7.0676	1.7140
10	1000	14.8640	4.8640	14.8090	1.3560	1212	14.4188	4.4188	14.4160	2.0190
16	250	18.0917	2.0917	18.1250	1.4080	250	17.8581	1.8581	17.8460	1.4540
20	1000	21.4622	1.4622	21.6590	1.9060	1081	24.5712	4.5712	24.5500	4.5140
25	250	27.9181	2.9181	28.1400	2.2720	250	26.3591	1.3591	26.2850	2.5530
30	1000	31.1726	1.1726	31.2120	2.4080	1142	32.1826	2.1826	32.1980	4.9640
40	250	38.8949	-1.1051	38.8790	1.4230	250	39.3512	-0.6488	39.3930	2.0240
45	250	44.8451	-0.1549	44.8600	0.4660	250	42.0317	-2.9683	42.1130	1.5380
Promedio			1.9381		1.5285			2.5090		2.5975
		Teñidos - Cámara B				Sin teñir - Cámara B				
5	250	5.8631	0.8631	5.8516	0.7151	250	8.4922	3.4922	8.4233	1.1540
10	1217	14.6157	4.6157	14.622	3.0520	1097	13.2906	3.2906	13.2780	2.4380
16	250	20.6073	4.6073	20.572	0.9700	250	19.2169	3.2169	19.1350	2.0060
20	1311	25.5649	5.5649	25.577	3.6690	1110	22.8296	2.8296	22.7860	3.8460
25	250	28.8953	3.8953	29.044	2.0790	250	28.7089	3.7089	28.8520	2.6690
30	1263	35.2173	5.2173	35.229	3.8700	1084	32.6386	2.6386	32.6020	2.6260
40	250	39.9656	-0.0344	39.949	1.4610	250	38.9695	-1.0305	38.9660	1.1350
45	250	42.8173	-2.1827	42.839	0.7010	250	40.4554	-4.5446	40.4290	1.2270
Promedio			3.3726		2.0646			3.0925		2.1376

Los resultados obtenidos indican que el modelo CNN es una alternativa confiable de acuerdo con los valores de la media y la desviación estándar para la cuantificación de MP en muestras líquidas. Además, los resultados también mostraron que usando la cámara B en muestras con MP teñidos y sin teñir se presenta mayor dispersión en los datos de acuerdo con el error del modelo CNN con respecto al valor real que es de 3.37 y 3.09, mientras que para los resultados obtenidos usando la cámara A es de 1.94 y 2.51, respectivamente. Este comportamiento también se presenta en el análisis estadístico, los resultados de la cuantificación MP teñidos en imágenes tomadas con la cámara A muestran σ promedio de 1.53, siendo la concentración de 25 y 30 MP las que presentan la mayor dispersión de datos, es decir, mayor variabilidad con respecto al valor real. Los resultados de las imágenes adquiridas con la cámara A y MP sin teñir indican la σ promedio es de 2.60, en este caso, las concentraciones de 20 y 30 MP son las que presentan la mayor variabilidad con respecto al valor real, desviándose entre 4 y 5 MP, respectivamente. Para la cuantificación de MP utilizando las imágenes adquiridas con la cámara B tanto para muestras con MP teñidos como sin teñir, se observa un incremento tanto en el error del modelo CNN como de la σ , ver detalle en la Tabla 4.10, lo que indica la importancia de reentrenar el modelo considerando la utilización de una cámara diferente.

4.3.2 Cuantificación de microplásticos en mezclas de materiales no plásticos con concentración conocida de microplásticos

La cuantificación de MP en mezclas de materiales no plásticos con concentración conocida de MP se realizó utilizando el modelo CNN entrenado con las imágenes tomadas con las cámaras A y B de las muestras con MP teñidos y sin teñir, se utilizaron un total de 300 imágenes para cada una de las concentraciones preparadas. Los resultados de la

cuantificación de MP en las mezclas de materiales no plásticos con concentraciones conocidas de MP se muestran en la Fig. 4.18, se presentan de forma acumulada utilizando los valores de concentración promedio; en la cuales se puede observar que las concentraciones de 5, 10 y 45 MP sin teñir mezclados con materiales no plásticos presentan mayor desviación del valor de la concentración promedio con respecto al valor real que las mezclas de materiales no plásticos con MP teñidos. Para la concentración de 20 MP las mezclas de materiales no plásticos con MP teñidos son las que muestran variabilidad del resultado con respecto al valor real, mientras que las mezclas de materiales no plásticos con MP sin teñir dan un resultado exacto, por otro lado, para las concentraciones de 16 y 25 MP muestran prácticamente la misma variabilidad tanto las mezclas de materiales no plásticos con MP teñidos como sin teñir, con respecto al valor real. Las concentraciones de 30 y 40 MP muestran el mismo comportamiento, donde la variabilidad de las mezclas de materiales no plásticos con MP teñidos es mayor que en las mezclas de materiales no plásticos con MP sin teñir, en las cuales, los resultados de las mezclas de materiales no plásticos con MP teñidos están por encima del valor real, mientras que las mezclas de materiales no plásticos con MP sin teñir están por debajo del valor real.



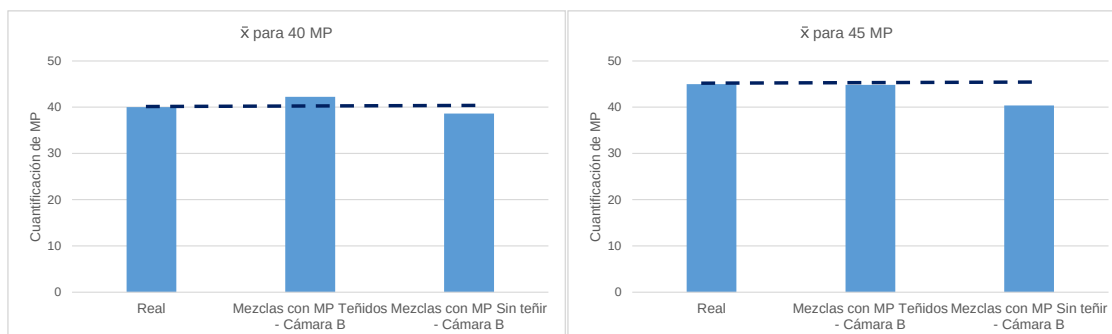


Fig. 4.18 Concentración promedio de MP teñidos y sin teñir en mezclas de materiales no plásticos con concentración conocida de MP, cuantificación de MP utilizando el modelo CNN.

El análisis estadístico realizado a los resultados de la cuantificación de MP mezclados con materiales no plásticos y los valores de $\bar{x}$ y el error que arroja el modelo CNN se muestran en la Tabla 4.11, donde se observa que la σ obtenida tanto para las muestras con MP teñidos como sin teñir es poco significativa, ya que el valor más elevado es de 1.31, lo que indica que la dispersión de los datos también es poco significativa. El caso de las mezclas de materiales no plásticos con MP teñidos las concentraciones de 16, 30 y 40 MP tienen un error del modelo CNN superior a 2, aun cuando sus valores de σ oscilan entre 0.77 y 1.31, por lo que el valor de $\bar{x}$ para estas concentraciones es el que más se desvía del valor real hasta 2 MP. Por otra parte, para las mezclas de materiales no plásticos con MP sin teñir, las concentraciones de 5, 16 y 45 MP son las que presentan el mayor error arrojado por el modelo CNN con 5.10, 2.27 y -3.64 respectivamente y, por lo tanto, una mayor dispersión en los datos, lo que queda en evidencia con el valor de $\bar{x}$ que se desvía del valor real con 5, 2 y 4 MP, aun cuando su σ es de 0.07 y 0.09 respectivamente.

Tabla 4.11. Resultados de la cuantificación MP en mezclas con materiales no plásticos con el modelo CNN y su análisis estadístico.

Mezclas con MP Teñidos - Cámara B				
	Modelo CNN		Minitab	
[MP]	$\bar{x}$	Error	$\bar{x}$	σ
5	5.0114	0.0114	6.0136	0.5679
10	10.3264	0.3264	10.6960	0.7800
16	18.2974	2.2974	18.2660	0.8240
20	21.7372	1.7372	21.8020	0.7960
25	26.3819	1.3819	26.3840	0.7930
30	32.2782	2.2782	32.2730	1.3060
40	42.1995	2.1995	42.2300	0.7690
45	44.8186	-0.1814	44.8180	0.1940
Promedio		1.3017		0.7537
Mezclas con MP Sin teñir - Cámara B				
5	10.1036	5.1036	10.0330	0.0727
10	11.1881	1.1881	11.1720	0.0488
16	18.2746	2.2746	18.3950	0.0860
20	20.1095	0.1095	20.1060	0.0161
25	25.5983	0.5983	25.6340	0.0280

30	28.5371	-1.4629	28.4730	0.0653
40	38.6407	-1.3593	38.6320	0.0804
45	41.3643	-3.6357	40.3630	0.0952
Promedio		1.9665		0.0616

Las concentraciones de 5, 10, 20, 25 y 45 MP teñidos mezclados con materiales no plásticos, así como las concentraciones de 10, 20, 25, 30 y 40 MP sin teñir mezclados con materiales no plásticos; arrojan un error obtenido de modelo CNN que varía desde -1.46 hasta 1.19 con valores de σ que no superan la unidad, generando una desviación de $\bar{x}$ menor a 2 MP con respecto al valor real. En la Tabla 4.12 se muestra una comparación de los errores del modelo CNN y las σ promedio obtenidas para la cuantificación de MP teñidos y sin teñir, en el punto 4.3.1 con respecto a los resultados obtenidos para las mezclas de materiales no plásticos con concentración conocida de MP, donde se observa que las desviaciones de la $\bar{x}$ obtenidas por el modelo CNN con respecto al valor real disminuyen, así como los valores de σ lo que indica que el modelo CNN es una herramienta confiable para la cuantificación de MP aunque se encuentren mezclados con materiales no plásticos. La comparación presentada muestra el desempeño del modelo CNN ante la introducción de variables como el uso de cámaras distintas y de la presencia de materiales no plásticos mezclados con MP tanto teñidos como sin teñir, permitiendo identificar las necesidades de reentrenamiento del modelo CNN en caso de que la dispersión de los datos o el error se incremente significativamente.

Tabla 4.12. Comparación de errores del modelo CNN y σ de los resultados de la cuantificación de MP teñidos y sin teñir y mezclas de materiales no plásticos con concentración conocida de MP.

Imágenes utilizadas	Características	Error Promedio del modelo CNN	Desv. Est. Promedio
4,250	MP teñidos - Cámara A	1.9381	1.5285
4,685	MP sin teñir - Cámara A	2.5090	2.5975
5,041	MP teñidos - Cámara B	3.3726	2.0646
4,541	MP sin teñir - Cámara B	3.0925	2.1376
2,400	Mezclas con MP teñidos - Cámara B	1.3017	0.7537
2,400	Mezclas con MP sin teñir - Cámara B	1.9665	0.0616

Por consiguiente, el modelo CNN desarrollado es una alternativa confiable para determinar la cantidad de MP en muestras líquidas sin que la mezcla presente en la muestra, concentración de MP, cámara utilizada y calidad de la imagen sean factores que interfieran significativamente en los resultados de la cuantificación de MP. Además, es importante mencionar que la tinción de los MP no interfiere en el desempeño del modelo CNN para la cuantificación de MP.

4.3.3 Evaluación global del modelo CNN para la cuantificación de microplásticos

La evaluación global del modelo CNN consistió en realizar la cuantificación de MP utilizando la versión del modelo CNN entrenada con MP teñidos y sin teñir utilizando imágenes tomadas con la cámara A y B, esta versión también se utilizó para la cuantificación de MP teñidos y sin teñir mezclados con materiales no plásticos. La evaluación del modelo CNN se realizó utilizando 13,832 imágenes seleccionadas aleatoriamente considerando como variables las cámaras A y B, MP teñidos y sin teñir, así como las mezclas de materiales no plásticos con de MP teñidos y sin teñir, en concentraciones de 5, 10, 16, 20, 25, 30, 40 y 45 MP. En la Tabla 4.13 se muestran los valores de $\bar{x}$ y errores obtenidos con el modelo CNN y los valores de $\bar{x}$ y σ del análisis estadístico para la cuantificación de MP.

Tabla 4.13. Cuantificación de MP - Evaluación global del modelo CNN.

		Modelo CNN		Minitab	
[MP]	Cantidad de Imágenes	$\bar{x}$	Error	$\bar{x}$	σ
5	750	7.3097	2.3097	7.3054	1.0432
10	3314	14.4148	4.4148	14.4280	2.2090
16	750	18.9581	2.9581	18.9490	1.2860
20	3421	22.5791	2.5791	22.5590	2.8760
25	750	27.7698	2.7698	27.7450	2.1240
30	3347	33.3517	3.3517	33.3900	3.4700
40	750	39.1070	0.8930	39.0650	1.7330
45	750	43.0214	-1.9786	43.0300	0.8620
Error del modelo CNN			2.7064		1.9504

Los resultados de la evaluación global del modelo CNN indican que los errores del modelo CNN y los valores de σ se incrementan con respecto a los resultados obtenidos de la cuantificación de MP teñidos y sin teñir, sección 4.3.1, así como con respecto a los resultados obtenidos de MP teñidos y sin teñir mezclados con materiales no plásticos, sección 4.3.2, por lo tanto, la dispersión de los datos es mayor, debido a que el error obtenido por el modelo CNN en esta fase es de 2.71 mientras que el valor de σ es de 1.95, siendo las concentraciones de 10 y 30 MP las que muestran mayor desviación de la concentración obtenida con respecto al valor real con 5 y 4 MP respectivamente.

Debido al incremento en la variabilidad de los resultados de la cuantificación de MP durante la evaluación global del modelo CNN, se reentrenó el modelo CNN con las imágenes de las mezclas de materiales no plásticos con MP teñidos y sin teñir y se realizó nuevamente la cuantificación de MP utilizando un total de 6,750 imágenes considerando como variables las cámaras A y B, MP teñidos y sin teñir, así como las mezclas de materiales no plásticos con MP teñidos y sin teñir, en las concentraciones de 5, 10, 16, 20, 25, 30, 40 y 45 MP. Es importante mencionar que estas imágenes no habían sido utilizadas previamente en alguna fase de entrenamiento, validación o evaluación del modelo CNN.

Los resultados de la cuantificación de MP con el modelo CNN reentrenado se comparan con los de la evaluación global y se muestran en la Fig. 4.19, indicando que el reentrenamiento permite que el modelo CNN aprenda las nuevas características

disminuyendo así los errores que arroja el modelo CNN con respecto al valor real de la concentración, además de que los valores de σ también disminuyen, incrementando con ello que la confiabilidad y exactitud de los resultados se incrementen. Los resultados obtenidos para la cuantificación de 10, 16, 20, 25 y 30 MP muestran una evidente disminución de la dispersión de los datos y con ello la variabilidad de los resultados, toda vez que el modelo CNN fue reentrenado, mientras que para la concentración de 5 MP no hay cambios significativos y para las concentraciones de 40 y 45 incluso el modelo CNN reentrenado presenta un incremento poco significativo de la variación de $\bar{x}$ con respecto al valor real obteniéndose valores por debajo de él.

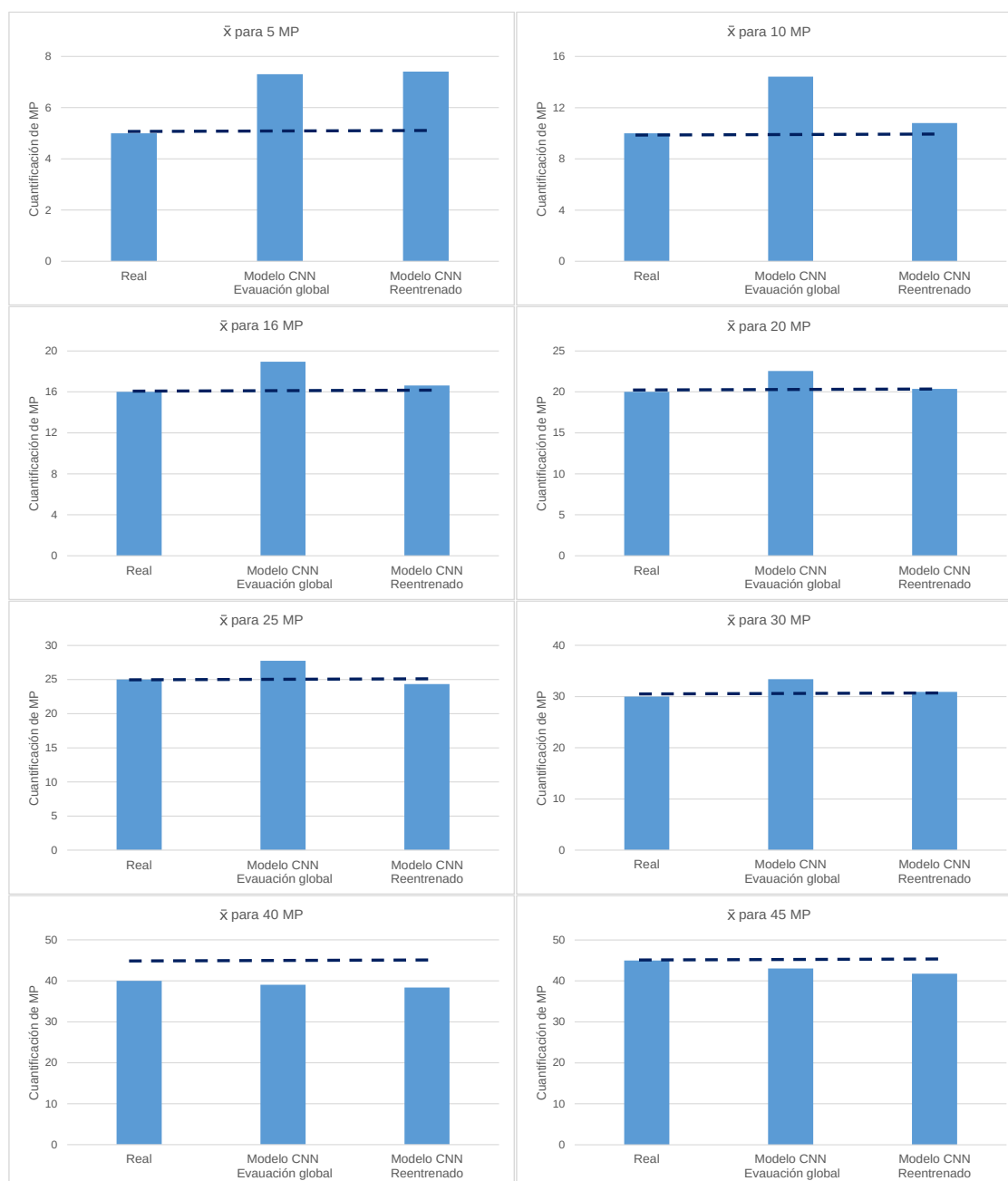


Fig. 4.19 Concentración promedio de MP, cuantificación de MP utilizando en modelo CNN original y reentrenado.

En la Tabla 4.14 se muestra una comparación de los errores que arroja el modelo CNN y las σ obtenidas del análisis estadístico, de las cuantificaciones previas y las realizadas con el modelo CNN reentrenado puede observarse el comportamiento del aumento del error del modelo CNN durante la evaluación global, y la disminución de este, cuando se realiza la cuantificación de MP con el modelo reentrenado lo que indica que la dispersión de los datos también disminuye. Con lo anterior es fundamental realizar un reentrenamiento del modelo CNN cada vez que se introduce una nueva variable para asegurar que el modelo ha adquirido las características necesarias de la imagen, de los MP teñidos y sin teñir y de los materiales no plásticos, es decir, el modelo debe robustecerse para asegurar la confiabilidad y exactitud de la herramienta.

Tabla 4.14. Comparación de las diferencias promedio y σ de los resultados de la cuantificación de MP utilizando el modelo CNN, evaluación global.

Imágenes utilizadas	Características	Error del modelo CNN	Desv. Est. Promedio
2,400	Mezclas con MP teñidos - Cámara B	1.3017	0.7537
2,400	Mezclas con MP sin teñir - Cámara B	1.9665	0.0616
13,832	Evaluación Global MP teñidos y sin teñir, Mezclas con MP teñidos y sin teñir cámara A y B	2.7064	1.9504
6,750	Evaluación Global con reentrenamiento MP teñidos y sin teñir, Mezclas con MP teñidos y sin teñir cámara A y B	1.2755	1.0669

La evaluación final del modelo CNN reentrenado se realizó con 9,911 imágenes adquiridas con una cámara distinta, denominada cámara C considerando los MP teñidos y sin teñir, y las mezclas de materiales no plásticos con concentraciones de 5, 10, 16, 20, 25, 30, 40 y 45 MP teñidos y sin teñir. Los resultados para cada concentración se presentan en la Fig. 4.20, en la cual se muestra que para la concentración de 5 MP las mezclas de materiales no plásticos con MP teñidos presenta una desviación significativa de $\bar{x}$ con respecto al valor real, en las concentraciones de 10, 16, 20 y 25 MP, la desviación de $\bar{x}$ con respecto al valor real entre las variables utilizadas para la adquisición de imágenes no es significativa y es menor en las soluciones de MP sin teñir y mezclas de materiales no plásticos con MP sin teñir. La concentración de 30 MP teñidos y mezclas de materiales no plásticos con MP teñidos presenta un incremento significativo en la variabilidad de $\bar{x}$ hasta en 6 MP. Las concentraciones de 40 y 45 MP sin teñir presentan una desviación significativa de $\bar{x}$ de 5 y 10 MP respectivamente, este comportamiento también se observa en las mezclas de materiales no plásticos con MP sin teñir para esas concentraciones con una desviación de $\bar{x}$ de hasta 5 MP para la concentración de 45 MP.

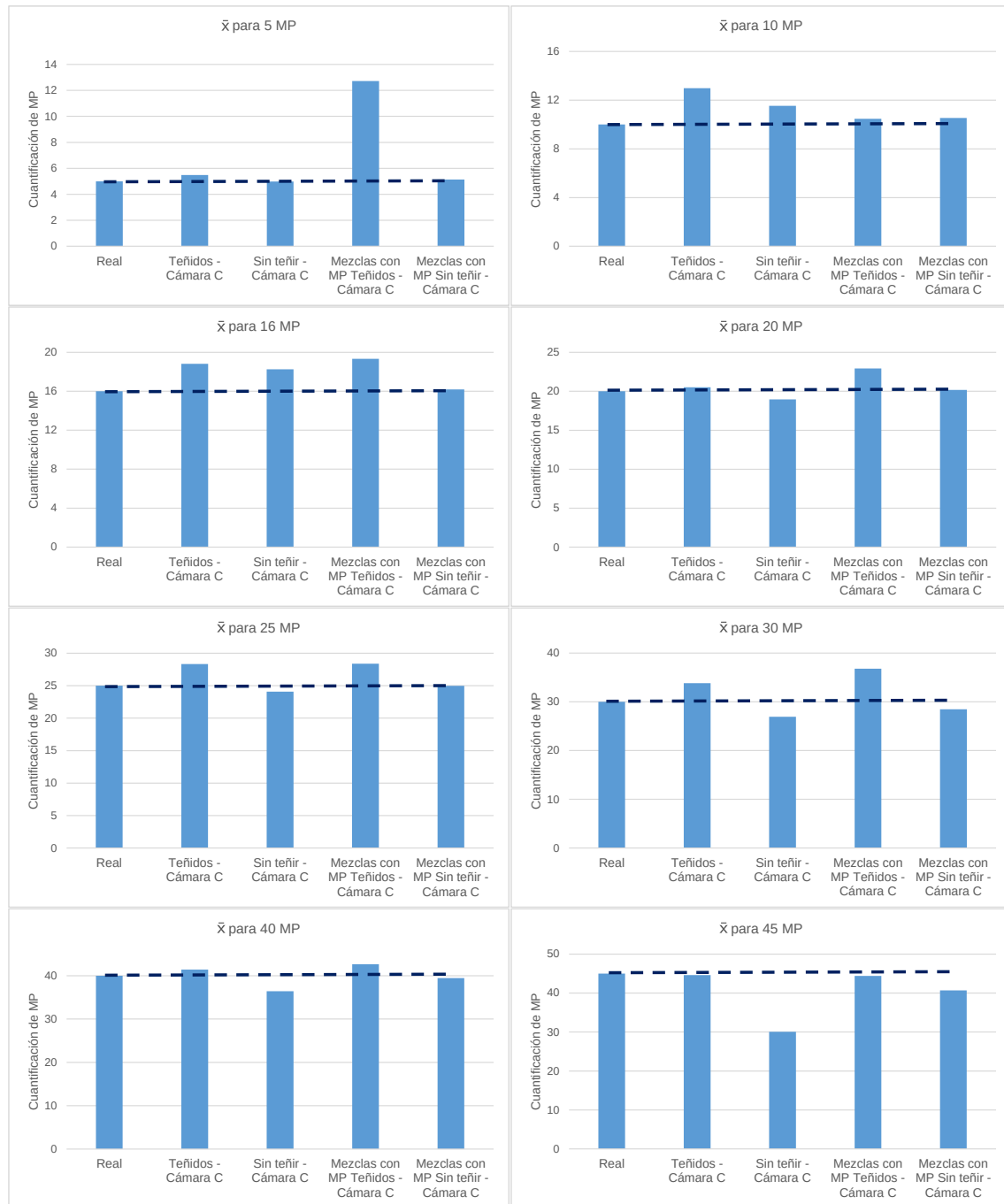


Fig. 4.20 Concentración promedio de MP, cuantificación de MP utilizando el modelo CNN reentrenado.

El análisis estadístico y el error del modelo CNN de los resultados obtenidos para la cuantificación de MP utilizando el modelo CNN reentrenado para las imágenes tomadas con la cámara C, indican que el modelo CNN requerirá un nuevo reentrenamiento para adquirir la información de la calidad de la imagen que proporciona la cámara C, debido a que el error que arroja el modelo CNN se incrementa para algunas de las concentraciones. Para los MP sin teñir y para las mezclas de materiales no plásticos con MP teñidos ese error se incrementó a 3.4483 y 3.4826 respectivamente, es importante mencionar que aun

cuando los valores de σ no se incrementan significativamente, la variación de los valores de $\bar{x}$ con respecto al valor real indica una mayor dispersión de los datos, lo que disminuye la exactitud del método con respecto al valor real de la concentración, aunque no su confiabilidad, ver Tabla 4.15.

Tabla 4.15. Resultados de la cuantificación de MP en imágenes adquiridas con la cámara C, utilizando el modelo CNN reentrenado y su análisis estadístico.

[MP]	Teñidos - Cámara C					Sin teñir - Cámara C				
	Cantidad Imágenes	Modelo CNN		Minitab		Cantidad Imágenes	Modelo CNN		Minitab	
		$\bar{x}$	Error	$\bar{x}$	σ		$\bar{x}$	Error	$\bar{x}$	σ
5	346	5.4850	0.4850	5.4885	0.4340	304	4.9906	-0.0094	4.9906	0.0703
10	316	13.0197	3.0197	12.982	1.7140	302	11.5136	1.5136	11.5340	2.1090
16	300	18.7405	2.7405	18.816	1.8610	305	18.3388	2.3388	18.2460	1.8110
20	301	20.4908	0.4908	20.51	2.0820	301	18.9382	-1.0618	18.9590	1.5970
25	348	28.3385	3.3385	28.336	1.3060	307	24.0456	-0.9544	24.0850	1.7020
30	348	33.8340	3.8340	33.842	1.3620	304	26.8897	-3.1103	26.9500	1.5440
40	300	41.4552	1.4552	41.436	1.7560	309	36.4745	-3.5255	36.4480	2.0560
45	307	44.6155	-0.3845	44.609	0.2480	300	29.9276	-15.0724	30.0630	3.1670
Promedio			1.9685		1.3454			3.4483		1.7570
[MP]	Mezclas con MP Teñidos - Cámara C					Mezclas con MP Sin teñir - Cámara C				
	Cantidad Imágenes	Modelo CNN		Minitab		Cantidad Imágenes	Modelo CNN		Minitab	
		$\bar{x}$	Error	$\bar{x}$	σ		$\bar{x}$	Error	$\bar{x}$	σ
5	307	12.7331	7.7331	12.7210	1.6530	304	5.1369	0.1369	5.1368	1.5911
10	312	10.4944	0.4944	10.4730	1.4640	307	10.5330	0.5330	10.5320	0.4445
16	302	19.3447	3.3447	19.3290	1.1240	305	16.1778	0.1778	16.1780	0.8310
20	310	22.9303	2.9303	22.9260	1.6120	300	20.1801	0.1801	20.1770	0.4040
25	314	28.2868	3.2868	28.3810	2.1120	308	24.9794	-0.0206	24.9790	0.4740
30	303	36.8637	-6.8637	36.8000	2.5740	309	28.4651	-1.5349	28.4730	0.3450
40	307	42.6204	2.6204	42.6500	0.5380	311	39.4468	-0.5532	39.4500	1.1140
45	303	44.4129	-0.5871	44.4140	0.1570	311	40.6617	-4.3383	40.6730	1.0430
Promedio			3.4826		1.4043			0.9344		0.7808

Las variaciones más significativas de $\bar{x}$ con respecto al valor real se presentan en las concentraciones de 25 y 30 MP teñidos, de 30, 40 y 45 MP sin teñir, de 16, 25 y 30 MP teñidos en mezclas de materiales no plásticos y de 45 MP sin teñir en mezclas con materiales no plásticos. Además, estas desviaciones evidencian la necesidad de un nuevo reentrenamiento del modelo CNN para la cuantificación de MP para recuperar la exactitud de los resultados con respecto a los valores de $\bar{x}$. La Tabla 4.16 muestra el desempeño del modelo CNN, la cantidad de imágenes utilizadas en cada fase de la cuantificación de MP, así como los errores arrojados por el modelo CNN con respecto a los valores reales de cada concentración analizada y los resultados del análisis estadístico.

Tabla 4.16. Desempeño del modelo CNN.

Fase #	Imágenes utilizadas	Características	Error del modelo CNN	Desv. Est. Promedio
1	4,250	MP teñidos – Cámara A	1.9381	1.5285
2	4,685	MP sin teñir – Cámara A	2.5090	2.5975
3	5,041	MP teñidos – Cámara B	3.3726	2.0646
4	4,541	MP sin teñir – Cámara B	3.0925	2.1376

N/A	2,400	Mezclas con MP teñidos – Cámara B	1.3017	0.7537
	2,400	Mezclas con MP sin teñir – Cámara B	1.9665	0.0616
5	13,832	Evaluación Global MP teñidos y sin teñir, Mezclas con MP teñidos y sin teñir cámara A y B	2.7064	1.9504
6	6,750	Evaluación con reentrenamiento MP teñidos y sin teñir, Mezclas con MP teñidos y sin teñir cámara A y B	1.2755	1.0669
7	2,566	MP teñidos – Cámara C	1.9685	1.3454
	2,432	MP sin teñir – Cámara C	3.4483	1.7570
	2,458	Mezclas con MP teñidos – Cámara C	3.4826	1.4043
	2,455	Mezclas con MP sin teñir – Cámara C	0.9344	0.7808

En la Fig. 4.21 se muestra la gráfica para el desempeño del modelo CNN en sus diversas fases de evaluación y entrenamiento. En esta gráfica se observa como los resultados de la Fase 2, 3 y 4 son las que presentan la mayor variabilidad con respecto a la concentración real de MP en la muestra, mientras que la Fase 6 y 7 tienen los resultados de concentración promedio más cercanas al valor real. Por lo tanto, el modelo CNN reentrenado, fase 6, es la que arroja los resultados más cercanos al valor real de cada una de las concentraciones analizadas mientras que, la fase 7, donde se utilizó la cámara C, incrementa su variabilidad con respecto a la fase 6, lo que hace evidente la necesidad de reentrenar nuevamente el modelo CNN.

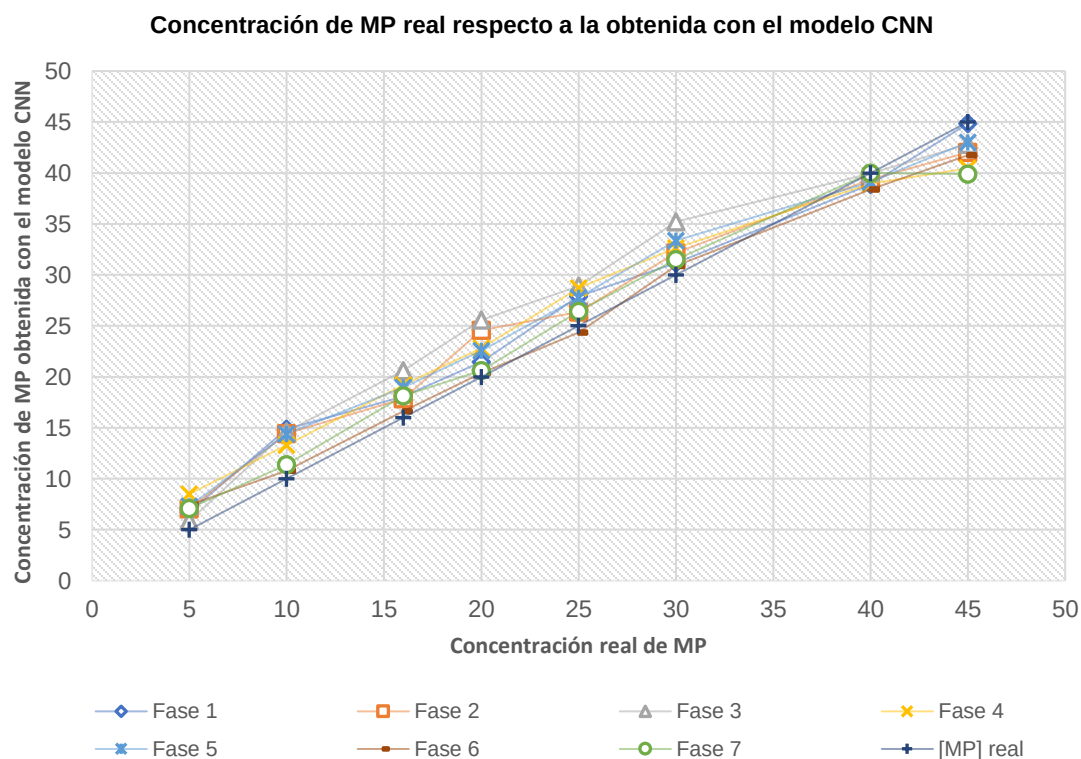


Fig. 4.21 Desempeño del modelo CNN.

En la Fig. 4.22 se muestra la concentración promedio obtenida considerando los resultados de las 7 fases de evaluación del modelo CNN. Además, se puede observar la variabilidad en el resultado de la concentración promedio obtenida con respecto al valor real para cada una de las concentraciones analizadas; indicando el desempeño general del modelo CNN, su confiabilidad y exactitud. Las desviaciones encontradas fueron de 3 MP para la concentración de 45 MP, de 2 MP para las concentraciones de 5, 10, 16, 20, 25 y 30 MP, mientras que para la concentración de 40 MP, el modelo es 100% exacto. Lo que hace a esta herramienta una alternativa confiable, rápida y económica para la cuantificación de MP en muestras líquidas.

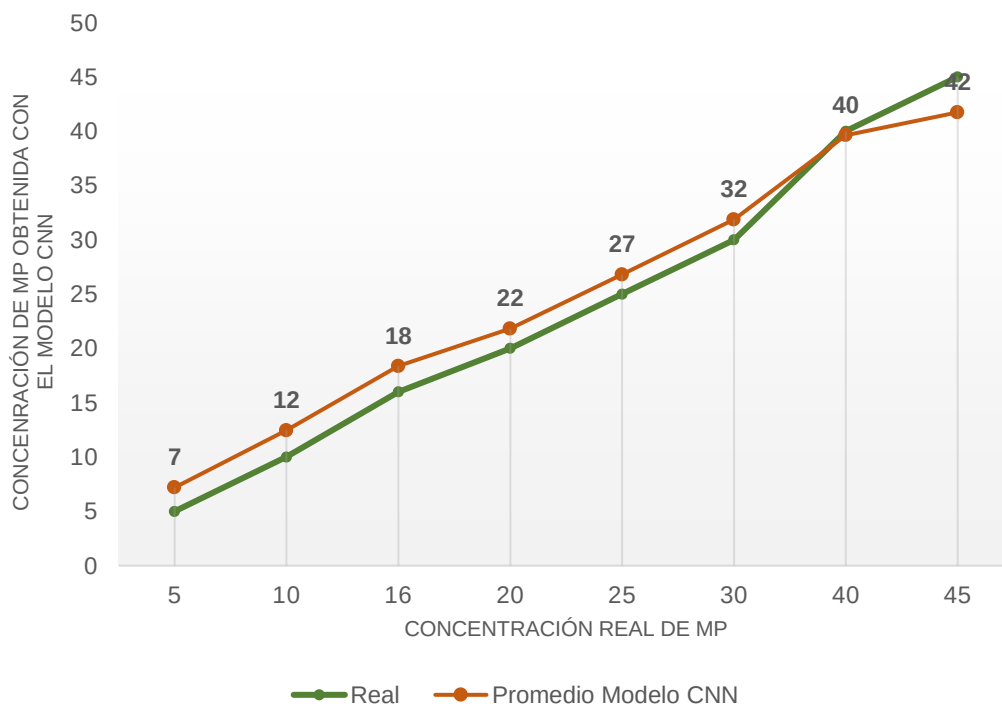


Fig. 4.22 Desempeño del modelo CNN en la cuantificación de MP promediando las 7 fases de evaluación y entrenamiento.

4.3.4 Discusión de resultados de la cuantificación de microplásticos utilizando el modelo CNN

El modelo CNN resulto es una técnica confiable para la cuantificación de MP, ya que fue entrenado para considerar múltiples factores que podrían afectar los resultados, tales como la superposición, aglomeración y precipitación de los MP, reflejos generados en la imagen, las paredes de las celdas, burbujas y ruido de la imagen, así como la distribución de los MP en el volumen de la celda. Además, el modelo CNN tiene la capacidad de diferenciar los MP de partículas no plásticas presentes en la muestra.

Los resultados obtenidos demuestran la necesidad de reentrenar el modelo cada vez que se introduce una variable significativa en el sistema, como el tipo de polímero, tipo de celda, calidad de la imagen o concentraciones distintas a las previamente analizadas; ya que el entrenamiento y validación del modelo CNN se realizó utilizando tres cámaras diferentes,

dos tipos de lentes, dos filtros distintos, y empleando MP de PE puros y mezclados con materiales no plásticos, tanto teñidos como sin teñir.

El modelo CNN también ha demostrado robustez frente a las variaciones presentes en la imagen, siendo capaz de detectar y cuantificar tanto MP teñidos como no teñidos. No obstante, es importante mencionar que tiene una mayor precisión y exactitud en los resultados con MP teñidos. Aunque algunos de los materiales no plásticos como el aserrín, MDF o naturaleza muerta pueden absorber el colorante RN, el modelo CNN no los detecta como MP. Esto se debe a que una vez entrenado el sistema es capaz de aprender las características distintivas de los MP, reduciendo significativamente la tasa de falsos positivos.

Conclusiones

El análisis realizado permite concluir que el uso del software ImageJ es adecuado para la cuantificación de MP en muestras líquidas, siendo un método confiable siempre y cuando las concentraciones no excedan los 16 MP. Para concentraciones mayores, la precisión del método disminuye debido a factores como la aglomeración de partículas, la calidad de la imagen y el ruido presente en ella.

Un parámetro crítico en este proceso es el valor del *threshold*, ya que una configuración inadecuada puede ocasionar tanto la omisión de MP como la detección de falsos positivos. Esto resalta la necesidad de estandarizar dicho valor para reducir la subjetividad del análisis y mejorar la reproducibilidad de los resultados. Asimismo, la calidad de la imagen, influenciada por la cámara, la iluminación y otros parámetros de adquisición, tiene un impacto directo en la confiabilidad del método.

En contraste, el modelo de red neuronal convolucional (CNN) se presenta como una herramienta significativamente más robusta y eficiente. Este modelo demostró una alta precisión y rapidez en la detección y cuantificación de MP, con tiempos de procesamiento entre 1 y 4 milisegundos por muestra. Su capacidad para adaptarse mediante reentrenamiento lo convierte en una alternativa versátil, capaz de operar eficazmente incluso en presencia de variaciones en el tipo de polímero, la celda utilizada o la calidad de imagen.

Particularmente destacable es la capacidad del modelo CNN para identificar MP teñidos con mayor exactitud, aunque también puede detectar MP sin teñir sin comprometer significativamente la confiabilidad de los resultados. Esta característica reduce la necesidad de tinción, disminuyendo así los costos y tiempos asociados a la preparación de muestras.

Entre las dos herramientas evaluadas, el modelo CNN ofrece mejores resultados en términos de precisión y confiabilidad. Su capacidad para operar sin necesidad de tinción y su bajo margen de error lo convierte en una opción superior frente al software ImageJ, representando un avance significativo hacia la implementación de metodologías automatizadas, objetivas y reproducibles para el análisis de MP en muestras líquidas.

Finalmente, al comparar ambas metodologías, se concluye que el modelo CNN ofrece un mejor desempeño general frente al software ImageJ, consolidándose como una solución avanzada y automatizada para el análisis cuantitativo de MP en entornos líquidos.

Trabajo Futuro

El presente estudio ha demostrado la utilidad del software ImageJ y, de manera destacada, del modelo de red neuronal convolucional (CNN) para la cuantificación de MP en muestras líquidas. Sin embargo, las sugerencias de trabajo futuro se enfocan en el modelo CNN ya que ofrece resultados más exactos y con menor dispersión que los obtenidos con el software ImageJ. El modelo CNN aún puede robustecerse, con el fin de optimizarlo y ampliar su alcance durante el desarrollo de futuras investigaciones. A continuación, se presentan algunas líneas de trabajo recomendadas:

En primer lugar, se propone ampliar el conjunto de entrenamiento del modelo CNN, incorporando imágenes de MP fabricados con diferentes polímeros, colores, formas y grados de degradación. También sería útil incluir muestras obtenidas en diversas condiciones ambientales reales, lo cual permitiría aumentar la capacidad de generalización del modelo y mejorar su aplicabilidad en estudios de campo.

Asimismo, se destaca la necesidad de desarrollar un protocolo estandarizado de adquisición y procesamiento de imágenes, que contemple parámetros como la iluminación, el contraste, la resolución y el fondo. Una estandarización en este sentido no solo reduciría el tiempo de análisis de los MP, sino que también contribuiría a mejorar el rendimiento del modelo CNN, al proporcionar imágenes más uniformes y limpias para su análisis.

Una línea de trabajo especialmente prometedora consiste en el desarrollo de un sistema portátil de análisis en tiempo real, integrando el modelo CNN en plataformas móviles. Esta innovación permitiría realizar análisis inmediatos en campo, facilitando el monitoreo ambiental de cuerpos de agua de manera rápida y precisa entre otros.

También sería de interés evaluar el desempeño del modelo CNN en matrices más complejas, tales como aguas residuales, agua de mar o líquidos con alta carga orgánica, con el objetivo de comprobar su robustez en contextos reales y ambientalmente representativos.

Finalmente, una posible expansión del presente trabajo consiste en integrar el análisis cuantitativo automatizado con técnicas de caracterización química, como la espectroscopía FTIR o Raman. Esta combinación permitiría no solo cuantificar MP, sino también identificar su composición química, logrando así una caracterización más completa y precisa.

En conjunto, estas líneas de trabajo representan un camino claro hacia el perfeccionamiento de metodologías automatizadas, objetivas y reproducibles para el análisis de MP, con un alto potencial de aplicación en investigaciones científicas relacionadas al tema.

Referencias

- [1] S. A. Mason, V. G. Welch, and J. Neratko, "Synthetic Polymer Contamination in Bottled Water," *Front Chem*, vol. 6, no. Sep, pp. 1-11, Sep. 2018, doi: 10.3389/fchem.2018.00407.
- [2] Plastics Europe Market Research Group (PEMRG) and Conversio Market & Strategy GmbH., "Plastics the fact 2021," *Plastics Europe*. [Online]. Available: <https://plasticseurope.org/>
- [3] W. Wang and J. Wang, "Investigation of microplastics in aquatic environments: An overview of the methods used, from field sampling to laboratory analysis," *TrAC - Trends in Analytical Chemistry*, vol. 108, no. Nov, pp. 195–202, Sep. 2018, doi: 10.1016/j.trac.2018.08.026.
- [4] J. Li, H. Liu, and J. Paul Chen, "Microplastics in freshwater systems: A review on occurrence, environmental effects, and methods for microplastics detection," *Water Res*, vol. 137, no. Jun, pp. 362–374, Jun. 2018, doi: 10.1016/j.watres.2017.12.056.
- [5] Y. Picó and D. Barceló, "Analysis and prevention of microplastics pollution in water: Current perspectives and future directions," *ACS Omega*, vol. 4, no. 4, pp. 6709–6719, Apr. 2019, doi: 10.1021/acsomega.9b00222.
- [6] S. Rezanian et al., "Microplastics pollution in different aquatic environments and biota: A review of recent studies," *Mar Pollut Bull*, vol. 133, no. Mar, pp. 191–208, Aug. 2018, doi: 10.1016/j.marpolbul.2018.05.022.
- [7] V. Hidalgo-Ruz, L. Gutow, R. C. Thompson, and M. Thiel, "Microplastics in the marine environment: A review of the methods used for identification and quantification," *Environ Sci Technol*, vol. 46, no. 6, pp. 3060–3075, Feb. 2012, doi: 10.1021/es2031505.
- [8] H. S. Auta, C. U. Emenike, and S. H. Fauziah, "Distribution and importance of microplastics in the marine environmentA review of the sources, fate, effects, and potential solutions," *Environ Int*, vol. 102, no. May, pp. 165–176, Mar. 2017, doi: 10.1016/j.envint.2017.02.013.
- [9] A. L. Andrady, "Microplastics in the marine environment," *Mar Pollut Bull*, vol. 62, no. 8, pp. 1596–1605, Aug. 2011, doi: 10.1016/j.marpolbul.2011.05.030.
- [10] V. S. Mukhanov, D. A. Litvinyuk, E. G. Sakhon, A. V. Bagaev, S. Veerasingam, and R. Venkatachalapathy, "A new method for analyzing microplastic particle size distribution in marine environmental samples," *Ecol Montenegrina*, vol. 23, no. 8th ISEM, pp. 77–86, Oct. 2019, doi: 10.37828/em.2019.23.10.
- [11] T. Stanton, M. Johnson, P. Nathanail, R. L. Gomes, T. Needham, and A. Burson, "Exploring the Efficacy of Nile Red in Microplastic Quantification: A Costaining Approach," *Environ Sci Technol Lett*, vol. 6, no. 10, pp. 606–611, Sep. 2019, doi: 10.1021/acs.estlett.9b00499.
- [12] M. Cole, P. Lindeque, C. Halsband, and T. S. Galloway, "Microplastics as contaminants in the marine environment: A review," *Mar Pollut Bull*, vol. 62, no. 12, pp. 2588–2597, Dec. 2011, doi: 10.1016/j.marpolbul.2011.09.025.
- [13] A. Cera, G. Cesarini, and M. Scalici, "Microplastics in freshwater: What is the news from the world?," *Diversity (Basel)*, vol. 12, no. 7–276, pp. 1–19, Jul. 2020, doi: 10.3390/d12070276.
- [14] R. Triebskorn et al., "Relevance of nano- and microplastics for freshwater ecosystems: A critical review," *TrAC - Trends in Analytical Chemistry*, vol. 110, no. 1, pp. 375–392, Jan. 2019, doi: 10.1016/j.trac.2018.11.023.
- [15] D. Eerkes-Medrano, R. C. Thompson, and D. C. Aldridge, "Microplastics in freshwater systems: A review of the emerging threats, identification of knowledge gaps

- and prioritisation of research needs,” *Water Res*, vol. 75, no. 5, pp. 63–82, May. 2015, doi: 10.1016/j.watres.2015.02.012.
- [16] A. A. Koelmans, N. H. Mohamed Nor, E. Hermesen, M. Kooi, S. M. Mintenig, and J. De France, “Microplastics in freshwaters and drinking water: Critical review and assessment of data quality,” *Water Res*, vol. 155, no. 5, pp. 410–422, May. 2019, doi: 10.1016/j.watres.2019.02.054.
- [17] M. Wagner et al., “Microplastics in freshwater ecosystems: what we know and what we need to know,” *Environ Sci Eur*, vol. 26, no. 1, pp. 1–9, Jul. 2014, doi: 10.1186/s12302-014-0012-7.
- [18] J. Domogalla-Urbansky et al., “Raman microspectroscopic identification of microplastic particles in freshwater bivalves (*Unio pictorum*) exposed to sewage treatment plant effluents under different exposure scenarios,” *Environmental Science and Pollution Research*, vol. 26, no. 2, pp. 2007–2012, Nov. 2019, doi: 10.1007/s11356-018-3609-3.
- [19] D. Schymanski, C. Goldbeck, H. U. Humpf, and P. Fürst, “Analysis of microplastics in water by micro-Raman spectroscopy: Release of plastic particles from different packaging into mineral water,” *Water Res*, vol. 129, no. 2, pp. 154–162, Feb. 2018, doi: 10.1016/j.watres.2017.11.011.
- [20] B. Ma, W. Xue, Y. Ding, C. Hu, H. Liu, and J. Qu, “Removal characteristics of microplastics by Fe-based coagulants during drinking water treatment,” *J Environ Sci (China)*, vol. 78, no. 4, pp. 267–275, Apr. 2019, doi: 10.1016/j.jes.2018.10.006.
- [21] EFSA CONTAM Panel, “Presence of microplastics and nanoplastics in food, with particular focus on seafood,” *EFSA Journal*, vol. 14, no. 6, pp. 1–30, Jun. 2016, doi: 10.2903/j.efsa.2016.4501.
- [22] L. Van Cauwenberghe and C. R. Janssen, “Microplastics in bivalves cultured for human consumption,” *Environmental Pollution*, vol. 193, no. 10, pp. 65–70, Jul. 2014, doi: 10.1016/j.envpol.2014.06.010.
- [23] S. Chen, Y. Li, C. Mawhorter, and S. Legoski, “Quantification of microplastics by count, size and morphology in beverage containers using Nile Red and ImageJ,” *J Water Health*, vol. 19, no. 1, pp. 79–88, Jan. 2021, doi: 10.2166/WH.2020.171.
- [24] A. C. Wiesheu, P. M. Anger, T. Baumann, R. Niessner, and N. P. Ivleva, “Raman microspectroscopic analysis of fibers in beverages,” *Analytical Methods*, vol. 8, no. 28, pp. 5722–5725, Jun. 2016, doi: 10.1039/c6ay01184e.
- [25] Thermo Fisher Scientific, “Straightforward identification of microplastic particles in bottled water,” 2019. Accessed: May 26, 2025. [Online]. Available: <chrome-extension://efaidnbnmnibpcajpcgclclefindmkaj/https://assets.thermofisher.com/TFS-Assets/MSD/Application-Notes/AN53167-identification-micro-plastics-bottled-water.pdf>
- [26] B. E. Oßmann, G. Sarau, H. Holtmannspötter, M. Pischetsrieder, S. H. Christiansen, and W. Dicke, “Small-sized microplastics and pigmented particles in bottled mineral water,” *Water Res*, vol. 141, no. 9, pp. 307–316, May. 2018, doi: 10.1016/j.watres.2018.05.027.
- [27] S. D. Traylor, E. F. Granek, M. Duncan, and S. M. Brander, “From the ocean to our kitchen table: anthropogenic particles in the edible tissue of U.S. West Coast seafood species,” *Frontiers in Toxicology*, vol. 6, no. 12, pp. 1–13, Dec. 2024, doi: 10.3389/ftox.2024.1469995.
- [28] S. M. Mintenig, M. G. J. Löder, S. Primpke, and G. Gerdt, “Low numbers of microplastics detected in drinking water from ground water sources,” *Science of the Total Environment*, vol. 648, no. 1, pp. 631–635, Jan. 2019, doi: 10.1016/j.scitotenv.2018.08.178.
- [29] K. D. Cox, G. A. Covernton, H. L. Davies, J. F. Dower, F. Juanes, and S. E. Dudas, “Human Consumption of Microplastics,” *Environ Sci Technol*, vol. 53, no. 12, pp. 7068–7074, Dec. 2019, doi: 10.1021/acs.est.9b01517.

- [30] F. Welle and R. Franz, "Microplastic in bottled natural mineral water—literature review and considerations on exposure and risk assessment," *Food Addit Contam Part A Chem Anal Control Expo Risk Assess*, vol. 35, no. 12, pp. 2482–2492, Nov. 2018, doi: 10.1080/19440049.2018.1543957.
- [31] D. Peixoto, C. Pinheiro, J. Amorim, L. Oliva-Teles, L. Guilhermino, and M. N. Vieira, "Microplastic pollution in commercial salt for human consumption: A review," *Estuar Coast Shelf Sci*, vol. 219, no. Feb, pp. 161–168, Apr. 2019, doi: 10.1016/j.ecss.2019.02.018.
- [32] A. B. Silva, A. S. Bastos, C. I. L. Justino, J. P. da Costa, A. C. Duarte, and T. A. P. Rocha-Santos, "Microplastics in the environment: Challenges in analytical chemistry - A review," *Anal Chim Acta*, vol. 1017, no. 8, pp. 1–19, Feb. 2018, doi: 10.1016/j.aca.2018.02.043.
- [33] J. C. Prata, J. R. Alves, J. P. da Costa, A. C. Duarte, and T. Rocha-Santos, "Major factors influencing the quantification of Nile Red stained microplastics and improved automatic quantification (MP-VAT 2.0)," *Science of the Total Environment*, vol. 719, no. 6, pp. 1–9, Feb. 2020, doi: 10.1016/j.scitotenv.2020.137498.
- [34] W. J. Shim, Y. K. Song, S. H. Hong, and M. Jang, "Identification and quantification of microplastics using Nile Red staining," *Mar Pollut Bull*, vol. 113, no. 1–2, pp. 469–476, Dec. 2016, doi: 10.1016/j.marpolbul.2016.10.049.
- [35] D. Schymanski et al., "Analysis of microplastics in drinking water and other clean water samples with micro-Raman and micro-infrared spectroscopy: minimum requirements and best practice guidelines," *Anal Bioanal Chem*, vol. 413, no. 24, pp. 5969–5994, Jul. 2021, doi: 10.1007/s00216-021-03498-y.
- [36] T. Maes, R. Jessop, N. Wellner, K. Haupt, and A. G. Mayes, "A rapid-screening approach to detect and quantify microplastics based on fluorescent tagging with Nile Red," *Sci Rep*, vol. 7, no. Feb, pp. 1–10, Mar. 2017, doi: 10.1038/srep44501.
- [37] J. C. Prata, V. Reis, J. T. V. Matos, J. P. da Costa, A. C. Duarte, and T. Rocha-Santos, "A new approach for routine quantification of microplastics using Nile Red and automated software (MP-VAT)," *Science of the Total Environment*, vol. 690, no. 11, pp. 1277–1283, Nov. 2019, doi: 10.1016/j.scitotenv.2019.07.060.
- [38] T. Rocha-Santos and A. C. Duarte, "A critical overview of the analytical approaches to the occurrence, the fate and the behavior of microplastics in the environment," *TrAC - Trends in Analytical Chemistry*, vol. 65, no. 2, pp. 47–53, Feb. 2015, doi: 10.1016/j.trac.2014.10.011.
- [39] J. Leonard, H. C. Koydemir, V. S. Koutnik, D. Tseng, A. Ozcan, and S. K. Mohanty, "Smartphone-enabled rapid quantification of microplastics," *Journal of Hazardous Materials Letters*, vol. 3, no. Apr, pp. 0–5, Apr. 2022, doi: 10.1016/j.hazl.2022.100052.
- [40] M. N. Miranda, A. R. T. Fernandes, A. M. T. Silva, and M. F. R. Pereira, "Behavior and removal of microplastics during desalination in a lab-scale direct contact membrane distillation system," *Desalination*, vol. 565, no. 11, pp. 116846, Nov. 2023, doi: 10.1016/j.desal.2023.116846.
- [41] G. Erni-Cassola, M. I. Gibson, R. C. Thompson, and J. A. Christie-Oleza, "Lost, but Found with Nile Red: A Novel Method for Detecting and Quantifying Small Microplastics (1 mm to 20 μ m) in Environmental Samples," *Environ Sci Technol*, vol. 51, no. 23, pp. 13641–13648, Nov. 2017, doi: 10.1021/acs.est.7b04512.
- [42] J. Wang et al., "Identification and detection of microplastic particles in marine environment by using improved faster R-CNN model," *J Environ Manage*, vol. 345, no. 11, pp. 118802, Nov. 2023, doi: 10.1016/j.jenvman.2023.118802.
- [43] A. Gauci, A. Deidun, J. Montebello, J. Abela, and F. Galgani, "Automating the characterisation of beach microplastics through the application of image analyses," *Ocean*

- Coast Manag*, vol. 182, no. Sep, pp. 104950, Dec. 2019, doi: 10.1016/j.ocecoaman.2019.104950.
- [44] L. M. Rios Mendoza and M. Balcer, "Microplastics in freshwater environments: A review of quantification assessment," *TrAC - Trends in Analytical Chemistry*, vol. 113, no. 4, pp. 402–408, Apr. 2019, doi: 10.1016/j.trac.2018.10.020.
- [45] J. S. Hanvey, P. J. Lewis, J. L. Lavers, N. D. Crosbie, K. Pozo, and B. O. Clarke, "A review of analytical techniques for quantifying microplastics in sediments," *Analytical Methods*, vol. 9, no. 9, pp. 1369–1383, Dec. 2017, doi: 10.1039/c6ay02707e.
- [46] X. Le Han, N. J. Jiang, T. Hata, J. Choi, Y. J. Du, and Y. J. Wang, "Deep learning based approach for automated characterization of large marine microplastic particles," *Mar Environ Res*, vol. 183, no. 1, pp. 105829, Jan. 2023, doi: 10.1016/j.marenvres.2022.105829.
- [47] W. Ng, B. Minasny, and A. McBratney, "Convolutional neural network for soil microplastic contamination screening using infrared spectroscopy," *Science of the Total Environment*, vol. 702, no. 2, pp. 134723, Feb. 2020, doi: 10.1016/j.scitotenv.2019.134723.
- [48] W. Zhang, W. Feng, Z. Cai, H. Wang, Q. Yan, and Q. Wang, "A deep one-dimensional convolutional neural network for microplastics classification using Raman spectroscopy," *Vib Spectrosc*, vol. 124, no. 1, pp. 103487, Jan. 2023, doi: 10.1016/j.vibspec.2022.103487.
- [49] L. Ren et al., "Identification of microplastics using a convolutional neural network based on micro-Raman spectroscopy," *Talanta*, vol. 260, no. 8, pp. 124611, Aug. 2023, doi: 10.1016/j.talanta.2023.124611.
- [50] J. Li, H. Liu, and J. Paul Chen, "Microplastics in freshwater systems: A review on occurrence, environmental effects, and methods for microplastics detection," *Water Res*, vol. 137, no. Jun, pp. 362–374, Jun. 2018, doi: 10.1016/j.watres.2017.12.056.
- [51] Munoz-Pineiro Maria Amalia, "Microplastics - Focus on Food and Health," Publications Office of the European Union, Luxembourg, ISBN N/A, JRC110629. Accessed: Aug. 25, 2022. [Online]. Available: <https://publications.jrc.ec.europa.eu/repository/handle/JRC110629>
- [52] J. P. G. L. Frias and R. Nash, "Microplastics: Finding a consensus on the definition," *Mar Pollut Bull*, vol. 138, no. 1, pp. 145–147, Jan. 2019, doi: 10.1016/j.marpolbul.2018.11.022.
- [53] UNEP, "Legal Limits on Single-Use Plastics and Microplastics: A Global Review of National Laws and Regulations," United Nations Environment Programme, EUA, 2018.
- [54] UNEP, "Single-use plastics, a roadmap for sustainability," United Nations Environment Programme, EUA, 2018.
- [55] T. Ekvall, C. Liptow, and S. Miliutenko, "Single-use plastic bags and their alternatives - Recommendations from Life Cycle Assessments." Accessed: Mar. 15, 2025. [Online]. Available: <chrome-extension://efaidnbmnnnibpcajpcglclefindmkaj/https://www.lifecycleinitiative.org/wp-content/uploads/2020/04/Single-use-plastic-bags-and-alternatives-Recommendations-from-LCA-final.pdf>
- [56] UNEP, "From pollution to solution to solution a global assessment of marine litter and plastic pollution," United Nations Environment Programme, EUA, 2021. [Online]. Available: <https://www.unep.org/>
- [57] P. M. Anger, E. von der Esch, T. Baumann, M. Elsner, R. Niessner, and N. P. Ivleva, "Raman microspectroscopy as a tool for microplastic particle analysis," *TrAC - Trends in Analytical Chemistry*, vol. 109, no. 12, pp. 214–226, Dec. 2018, doi: 10.1016/j.trac.2018.10.010.

- [58] B. Ma, W. Xue, C. Hu, H. Liu, J. Qu, and L. Li, "Characteristics of microplastic removal via coagulation and ultrafiltration during drinking water treatment," *Chemical Engineering Journal*, vol. 359, no. 3, pp. 159–167, Mar. 2019, doi: 10.1016/j.cej.2018.11.155.
- [59] F. de química UNAM, "Procesos de Separación," Procesos de tratamiento de aguas residuales, objetivos y selección de tecnologías en función al tipo de reutilización, pp. 1–120, 2010, Accessed: May 10, 2020. [Online]. Available: <http://depa.fquim.unam.mx/procesos/PDF/ProcesosI.pdf>
- [60] Universidad de Barcelona, "Operaciones Básicas en el Laboratorio de Química. Filtración. Filtración al Vacío," UB. Accessed: May 12, 2020. [Online]. Available: http://www.ub.edu/oblq/oblq_castellano/filtracio_buit.html
- [61] M. Tamminga, E. Hengstmann, and E. K. Fischer, "Nile Red Staining as a Subsidiary Method for Microplastic Quantification: A Comparison of Three Solvents and Factors Influencing Application Reliability," *Journal of Earth Sciences & Environmental Studies*, vol. 2, no. 2, pp. 165–172, Feb. 2017, doi: 10.15436/JESES.2.2.1.
- [62] S. Torres Hernández, "Comparativa metodológica y propuesta de un protocolo para la extracción y detección mediante fluorescencia de microplásticos en muestras biológicas," Grau de Biologia, Universitat de les Illes Cincies, España, 2017. [Online]. Available: <http://dspace.uib.es/xmlui/handle/11201/148188>
- [63] E. G. Karakolis, B. Nguyen, J. B. You, C. M. Rochman, and D. Sinton, "Fluorescent Dyes for Visualizing Microplastic Particles and Fibers in Laboratory-Based Studies," *Environ Sci Technol Lett*, vol. 6, no. 6, pp. 334–340, Jun. 2019, doi: 10.1021/acs.estlett.9b00241.
- [64] C. Albrecht, "Joseph R. Lakowicz: Principles of fluorescence spectroscopy, 3rd Edition," *Anal Bioanal Chem*, vol. 390, no. 5, pp. 1223–1224, Jan. 2008, doi: 10.1007/s00216-007-1822-x.
- [65] E. Hengstmann and E. K. Fischer, "Nile red staining in microplastic analysis—proposal for a reliable and fast identification approach for large microplastics," *Environ Monit Assess*, vol. 191, no. 10, pp. 1–9, Oct. 2019, doi: 10.1007/s10661-019-7786-4.
- [66] P. Bankhead, Analyzing fluorescence microscopy images with ImageJ, no. May. EUA: Nikon Imaging Center, 2014. Accessed: Aug. 25, 2022. [Online]. Available: https://confocal.uconn.edu/wp-content/uploads/sites/1081/2016/02/2014-05_Analyzing_fluorescence_microscopy_images.pdf
- [67] T. Valente et al., "Image processing tools in the study of environmental contamination by microplastics: reliability and perspectives," *Environmental Science and Pollution Research*, vol. 30, no. 1, pp. 298–309, Jul. 2023, doi: 10.1007/s11356-022-22128-3.
- [68] C. B. Simmerman and J. K. Coleman Wasik, "The effect of urban point source contamination on microplastic levels in water and organisms in a cold-water stream," *John Wiley and Sons Inc.*, vol. 3, no. 6, pp. 1417, Feb. 2020, doi: 10.1002/lol2.10138.
- [69] L. Nichele, V. Persichetti, M. Lucidi, and G. Cincotti, "Quantitative evaluation of ImageJ thresholding algorithms for microbial cell counting," *OSA Contin*, vol. 3, no. 6, pp. 1417, Jun. 2020, doi: 10.1364/osac.393971.
- [70] L. Alzubaidi et al., "Review of deep learning: concepts, CNN architectures, challenges, applications, future directions," *J Big Data*, vol. 8, no. 1, pp. 1-74, Mar. 2021, doi: 10.1186/s40537-021-00444-8.
- [71] S. Saha, "A Comprehensive Guide to Convolutional Neural Networks — the ELI5 way | by Sumit Saha | Towards Data Science," *Towards data Science*. [Online]. Available: <https://towardsdatascience.com/a-comprehensive-guide-to-convolutional-neural-networks-the-eli5-way-3bd2b1164a53>

- [72] A. Patil and M. Rane, "Convolutional Neural Networks: An Overview and Its Applications in Pattern Recognition," *Smart Innovation, Systems and Technologies*, vol. 195, no. 10, pp. 21–30, Oct. 2021, doi: 10.1007/978-981-15-7078-0_3.
- [73] A. A. Cruz-Salas et al., "Measures to prevent cross-contamination in the analysis of microplastics: A short literature review," *Revista Internacional de Contaminacion Ambiental*, vol. 39, no. 7, pp. 241–256, Jun. 2023, doi: 10.20937/RICA.54740.
- [74] Minitab, "Soporte de Minitab® 18." Accessed: Nov. 27, 2021. [Online]. Available: <https://support.minitab.com/es-mx/minitab/18/>