PROTOCOLO REPLICABLE: MUESTREO Y DIGESTIÓN DE LA MATERIA ORGÁNICA EN EL CANGREJO DE MANGLAR (*Ucides occidentalis)* Y EN LA CONCHA NEGRA *(Anadara tuberculosa)* PARA EL MONITOREO DE LA CONTAMINACIÓN POR MICROPLÁSTICOS EN LA REGIÓN TUMBES-PERÚ

REPLICABLE PROTOCOL: SAMPLING AND DIGESTION OF ORGANIC MATTER IN *Ucides occidentalis* AND *Anadara tuberculosa* WAS DEVELOPED FOR MONITORING MICROPLASTIC POLLUTION IN COMMERCIAL INVERTEBRATES IN THE TUMBES REGION, PERU

Angélica Aguirre-Sánchez[1] *Percy Montero*[2] *Sara Purca*[3]

RESUMEN

*Aguirre-Sánchez, A., Montero, P. & Purca, S. (2025). Protocolo replicable: muestreo y digestión de la materia orgánica en el cangrejo de manglar (*Ucides occidentalis*) y en la concha negra (*Anadara tuberculosa*) para el monitoreo de la contaminación por microplásticos en la Región Tumbes, Perú. Inf Inst Mar Perú, 52(1), 5-18.-* Los ecosistemas de manglar almacenan gran cantidad de desechos plásticos en sus estructuras y sedimento, afectando negativamente a las especies de invertebrados que habitan en él. Se han aplicado distintas metodologías para la evaluación de microplásticos en invertebrados marinos; sin embargo, es necesario estandarizar un protocolo para la evaluación de microplásticos en los invertebrados de los manglares peruanos. Por ende, se elaboró un protocolo metodológico replicable del muestreo y digestión de la materia orgánica en el cangrejo de manglar *Ucides occidentalis* y en la concha negra *Anadara tuberculosa,* para el monitoreo de la contaminación por microplásticos en invertebrados comerciales de la Región de Tumbes, Perú; el cual se detalla en el presente documento.

Palabras clave: protocolo, microplásticos, invertebrados, especies comerciales

ABSTRACT

Aguirre-Sánchez, A., Montero, P. & Purca, S. (2025). Replicable protocol: sampling and digestion of organic matter in Ucides occidentalis *and* Anadara tuberculosa *was developed for monitoring microplastics pollution in commercial invertebrates in the Tumbes Region, Peru. Inf Inst Mar Peru, 52(1), 5-18.-* Mangrove ecosystems store a large amount of plastic waste in their structures and sediment, negatively affecting the invertebrate species that inhabit it. Different methodologies have been evaluated for the evaluation of microplastics in marine invertebrates; however, it is necessary to standardize a protocol for the evaluation of microplastics in invertebrates in Peruvian mangroves. Therefore, in this document, a replicable methodological protocol for the sampling and digestion of organic matter in the mangrove crab *Ucides occidentalis* and the black ark *Anadara tuberculosa* was developed for monitoring microplastics contamination in commercial invertebrates in the Tumbes region, Peru.

Keywords: protocol, microplastics, invertebrates, and commercial species

1. INTRODUCCIÓN

Los microplásticos son polímeros orgánicos con distintas composiciones químicas, densidades, formas y tamaños (de 1 µm a 5 mm) (Crawford & Quinn, 2017). Pueden ser derivados de la degradación hidrolítica, foto-degradación, degradación termo-oxidativa y biodegradación (microplásticos secundarios) (Zeenat *et al*., 2021) o ser fabricados de ese tamaño en específico (microplásticos pri-

1. INTRODUCTION

Microplastics are organic polymers with different chemical compositions, densities, shapes, and sizes (range 1µm-5 mm) (Crawford & Quinn, 2017). They can be derived from hydrolytic degradation, photo-degradation, thermo-oxidative degradation, and biodegradation (secondary microplastics) (Zeenat *et al*., 2021) or be manufactured in that specific size (primary

1 Facultad de Ciencias Veterinarias y Biológicas, Biología Marina, Laboratorio de Ecología Marina, Universidad Científica del Sur, Panamericana Sur 19, Lima 15067, Perú. Orcid: 0000-0001-9477-7651
2 IMARPE Tumbes, Esquina José Olaya y Francisco Bolognesi s/n, C.P. Nueva Esperanza, Contralmirante Villar, Tumbes. Orcid: 0009-0002-5626-3590. pmontero@imarpe.gob.pe
3 Área Funcional de Investigaciones Marino Costeras (AFIMC). Dirección General de Investigaciones en Acuicultura (DGIA), Instituto del Mar del Perú (IMARPE), sede central, Esquina Gamarra y Gral. Valle S/N, Chucuito-Callao, Perú. 0000-0001-8751-1476. spurca@imarpe.gob.pe

marios) (Lehtiniemi *et al*., 2018). Estos componentes tienen aditivos que son agregados intencionalmente durante su producción para mantener y mejorar sus propiedades (Do *et al*., 2022); aunque suelen filtrarse al medio circundante debido a que los aditivos plásticos no están unidos covalentemente a la matriz (Do *et al*., 2022; Kwan & Takada, 2016). Sus características permiten ser transportados por el viento al medio acuático y/o terrestre, favoreciendo su presencia y persistencia en todos los ecosistemas del mundo, en especial en los ecosistemas de manglar (Akdogan & Guven, 2019; Verla *et al*., 2019; Zhang *et al*., 2020).

El manglar es un ecosistema intermareal que se encuentra en las costas subtropicales y tropicales, considerados "Carbono Azul" por su eficacia en la captura de dióxido de carbono atmosférico para producción de biomasa y su almacenamiento en el sedimento (Aldana-Gutiérrez *et al*., 2021; John *et al*., 2022; Sasmito *et al*., 2019). Asimismo, son considerados un filtro biológico natural para los desechos plásticos provenientes de fuentes marinas, terrestres y atmosféricas (Wang *et al*., 2023). Sus estructuras actúan como trampas para los plásticos, que a través del tiempo son degradados hasta convertirse en microplásticos; afectando negativamente al ambiente marino, especialmente a las especies de invertebrados asociadas a las raíces del mangle (Garcés-Ordóñez *et al*., 2020).

Los manglares también hospedan fauna de gran importancia ecológica, social y económica (Wang *et al*., 2023). En Tumbes, entre los principales recursos hidrobiológicos de valor comercial están el cangrejo de manglar *Ucides occidentalis* y la concha negra *Anadara tuberculosa* (Ordinola Zapata, 2022), los cuales se encuentran expuestos a partículas de plástico provenientes del agua (Li *et al*., 2020), sedimento (Maghsodian *et al*., 2022) y aire (Sridharan *et al*., 2021), encontrándose principalmente en las branquias y tractos digestivos de los cangrejos (Aguirre-Sánchez *et al*., 2022; Watts *et al*., 2014; Zhang *et al*., 2021) y en todo el tejido blando de los bivalvos (Ding *et al*., 2021, 2022; Wang *et al*., 2021); causando efectos adversos como variaciones en la fertilidad, estrés oxidativo, inflamaciones, cambios en el metabolismo entre otros (Hodkovicova *et al*., 2022).

Para monitorear la presencia de microplásticos en la biota, se han evaluado distintas metodologías para aislar microplásticos de invertebrados

microplastics) (Lehtiniemi *et al*., 2018). These components have additives that are intentionally added during their production to maintain and improve their properties (Do *et al*., 2022). Although they tend to leak into the surrounding medium because the plastic additives are not covalently bound to the matrix (Do *et al*., 2022; Kwan & Takada, 2019). Its characteristics allow it to be transported by the wind to the aquatic and/or terrestrial environment, allowing its presence and persistence in all ecosystems in the world, especially in mangrove ecosystems (Akdogan & Guven, 2019; Verla *et al*., 2019; Zhang *et al*., 2020).

The mangrove swamp is an intertidal ecosystem found on subtropical and tropical coasts, considered "Blue Carbon" due to its efficiency in capturing atmospheric carbon dioxide for biomass production and its storage in the sediment (Aldana-Gutiérrez *et al*., 2021; John *et al*., 2022; Sasmito *et al*., 2019). Likewise, they are considered a natural biological filter for plastic waste from marine, terrestrial and atmospheric sources (Wang *et al*., 2023). Its structures act as traps for plastics that degrade over time until they become microplastics, negatively affecting the surrounding fauna, especially the invertebrate species associated with mangrove roots (Garcés Ordóñez *et al*., 2019).

Mangroves also host a unique fauna of great ecological, social and economic importance (Wang *et al*., 2023). In Tumbes, the main hydrobiological resources of commercial value are the mangrove crab *Ucides occidentalis* and the black ark *Anadara tuberculosa* (Ordinola Zapata, 2022). Which are highly exposed to plastic particles from water (Li *et al*., 2020), sediment (Maghsodian *et al*., 2022), and air (Sridharan *et al*., 2021), being found mainly in the gills and digestive tracts of crabs (Aguirre-Sánchez *et al*., 2022; Watts *et al*., 2014; Zhang *et al*., 2021) and throughout the soft tissue of bivalves (Ding *et al*., 2021, 2022; Wang *et al*., 2021). Causing adverse effects such as variations in fertility, oxidative stress, inflammation, and changes in metabolism among others (Hodkovicova *et al*., 2022).

marinos (Cole *et al*., 2014). Estos distintos métodos presentan diferentes ventajas y desventajas (Schrank *et al*., 2022). Por ejemplo, las soluciones ácidas como H_2SO_4, HNO_3 y HCl digieren efectivamente toda la materia orgánica; sin embargo, dañan a los polímeros con baja tolerancia al pH (Cole *et al*., 2014; Imhof *et al*., 2016; Pfeiffer & Fischer, 2020). Los agentes oxidantes como H_2O_2 y la reacción de Fenton remueven efectivamente el material biogénico, pero en exposición prolongada a altas temperaturas blanquean los polímeros plásticos (Cole *et al*., 2014; Pfeiffer & Fischer, 2020; Schrank *et al*., 2022; Tagg *et al*., 2017), la digestión enzimática presenta dificultades durante su implementación y algunos problemas de eficacia (Dehaut *et al*., 2016). Sin embargo, el método alcalino con 10% KOH es el más efectivo para la digestión de materia orgánica en cangrejos, peces y mejillón (Dehaut *et al*., 2016).

Por este motivo, el presente documento tiene como objetivo elaborar un protocolo metodológico replicable del muestreo y digestión de la materia orgánica en el cangrejo de manglar *Ucides occidentalis* y la concha negra *Anadara tuberculosa*, para el monitoreo de la contaminación por microplásticos en invertebrados comerciales.

2. MATERIALES Y MÉTODOS

Los manglares son considerados sumideros de microplásticos (Zhang *et al*., 2022). En Perú, los ecosistemas de manglar se encuentran en las provincias de Zarumilla y Tumbes en la Región Tumbes y Sechura en la Región Piura; los cuales albergan una gran biodiversidad de flora y fauna, destacando entre ellos el cangrejo de manglar y la concha negra (Angulo, 2014).

Control de calidad

Previo al muestreo, se deben evaluar los procesos de control de calidad para minimizar la contaminación cruzada por microplásticos.

En campo. Los investigadores involucrados en la salida de campo deberán usar equipo de protección de algodón (Prata *et al*., 2021). La mayoría de utensilios que se llevarán al campo serán reemplazados por elementos no plásticos: vidrio, madera, metal; asimismo, deberán ser lavados tres veces con detergente y agua destilada filtrada previo al uso (Brander *et al*., 2020; Prata *et al*., 2021).

To monitor the presence of microplastics in the biota, different methodologies have been evaluated to isolate microplastics from marine invertebrates (Cole *et al*., 2014). These different methods have different advantages and disadvantages (Schrank *et al*., 2022). For example: acidic solutions like H_2SO_4, HNO_3, and HCl effectively digest all organic matter; however, they damage polymers with a low tolerance to pH (Cole *et al*., 2014; Imhof *et al*., 2016; Pfeiffer & Fischer, 2020), oxidizing agents such as H_2O_2, and the Fenton reaction effectively remove biogenic material. but in prolonged exposure to high temperatures plastic polymers bleach (Cole *et al*., 2014; Pfeiffer & Fischer, 2020; Schrank *et al*., 2022; Tagg *et al*., 2016), enzymatic digestion presents difficulties during its implementation and some efficacy issues (Dehaut *et al*., 2016). However, the alkaline method with 10% KOH is the most effective for the digestion of organic matter in crabs, fish and mussels (Dehaut *et al*., 2016).

For this reason, this document aims to develop a replicable methodological protocol for the sampling and digestion of organic matter in the mangrove crab *Ucides occidentalis* and the black ark *Anadara tuberculosa* for monitoring microplastic contamination in commercial invertebrates.

2. MATERIALS Y METHODS

Mangroves are considered sinks for microplastics (Zhang *et al*., 2022). In Peru, mangrove ecosystems are found in the provinces of Tumbes and Piura, which are home to a great biodiversity of flora and fauna, highlighting among them the mangrove crab and the black ark (Angulo, 2014).

Quality control

Prior to sampling, quality control processes must be evaluated to minimize cross-contamination by microplastics.

In field. The researchers involved in the field trip must use cotton protective equipment (Prata *et al*., 2021). Most of the utensils that will be taken to the field will be replaced by non-plastic elements: glass, wood, metal; likewise, they should be washed three times with detergent and filtered distilled water prior to use (Brander *et al*., 2020; Prata *et al*., 2021).

En laboratorio. Para asegurar y evaluar el control de calidad durante el proceso de análisis de microplásticos, se procederá a usar los métodos de Prata *et al*. (2021):

c. Reducción de contaminación aérea
   - Evitar el aire acondicionado (minimizar el flujo de aire en el laboratorio)
   - Realizar todos los procesos en la campana de flujo laminar

d. Reducción de contaminación cruzada
   - Emplear materiales de vidrio y metal
   - Previo al uso, lavar todos los materiales tres veces con agua destilada filtrada
   - Lavar los materiales entre cada muestra

e. Controles de contaminación
   - Emplear blancos durante la recolección de muestras
   - Emplear blancos durante el tratamiento de las muestras
   - Dejar un filtro destapado para el control de contaminación aérea

Recolección de muestras *in situ.* Para la recolección de la biota en el ecosistema de manglar, se trazará una línea perpendicular al canal de marea de una longitud de 30 metros, desde la orilla del canal hacia el interior del manglar empleando una cuerda graduada. Los especímenes se recolectarán aleatoriamente en tres metros cuadrados, a distancias de 0, 10, 20 y 30 de la orilla del canal (Figura 1).

La recolección de las muestras se realizará durante bajamar o marea baja que tiene una duración de hasta cinco horas continuas (Martínez Grimaldo de Takahashi, 2021). Para el cangrejo de manglar se empleará el método utilizado por los cangrejeros, empleando un alambre de un metro de longitud con la punta doblada en forma de gancho, o la mano que esté cubierta por guantes y dedales de tela (Ordinola *et al*., 2010; Martínez Grimaldo de Takahashi, 2021). Durante la recolección de las conchas negras, cada dedo debe estar cubierto por dedales hechos de tela o guantes para su protección contra las raíces del mangle (Azabache Cobeña, 2016; Martínez Grimaldo de Takahashi, 2021).

En cada estación se registrarán la hora de inicio y final del muestreo y la posición geográfica, la que

In lab. To ensure and evaluate quality control during the microplastic analysis process, the methods of Prata *et al.* (2021) will be used:

a. Aerial contamination reduction
   - Avoid air conditioning (minimize airflow in the laboratory).
   - Carry out all processes in the laminar flow hood.

b. Cross contamination reduction
   - Use glass and metal materials
   - Prior to use, wash all materials three times with filtered distilled water.
   - Wash materials between each sample

c. Pollution controls
   - Use blanks during sample collection.
   - Use blanks during sample treatment
   - Leave a filter uncovered for air pollution control.

Collection of samples *in situ*. For the collection of biota in the mangrove ecosystem, a line will be drawn perpendicular to the tidal channel with a length of 30 meters from the edge of the channel towards the interior of the mangrove using a graduated rope. The specimens will be collected randomly in three square meters at distances of 0, 10, 20 and 30 from the edge of the canal (Figure 1).

The collection of the samples will be carried out during low tide or low tide that lasts up to five continuous hours (Martínez Grimaldo de Takahashi, 2021). For the mangrove crab, the method used by crabbers will be used when using a 1 m long wire with the tip bent in the shape of a hook or the hand (Ordinola *et al*., 2010; Martínez Grimaldo de Takahashi, 2021). During the collection of black shells, each finger should be covered by thimbles made of cloth or gloves for protection against mangrove roots (Azabache Cobeña, 2016; Martínez Grimaldo de Takahashi, 2021).

At each station, the start and end time of the sampling and the geographical position will be recorded, which will be obtained with a GPS navigator; geographic coordinates will

será obtenida con un navegador GPS; las coordenadas geográficas se registrarán en unidades sexagesimales, referidas al Datum WGS 84 (Anexo 1). Los ejemplares extraídos de *U. occidentalis* y *A. tuberculosa* en cada punto de muestreo serán contabilizados y luego guardados en una caja con algodón, para su posterior análisis en el laboratorio (Aguirre-Sánchez *et al*., 2022).

Análisis en laboratorio

Con el empleo de un vernier digital, se medirá el ancho del cefalotórax (AC) de cada ejemplar; con una balanza digital se obtendrá el peso total del ejemplar. Los tejidos objetivo de la investigación serán diseccionados, pesados individualmente y, posteriormente, serán cubiertos en papel aluminio, etiquetados y codificados adecuadamente para su preservación por congelación hasta su análisis (Naji *et al*., 2018).

Separación por densidades

La separación por densidades es una técnica que se utiliza para la extracción de microplásticos del sedimento (Nakajima *et al*., 2019), esta se realiza agitando el sedimento en una solución sobresaturada (Thompson, 2015). Debido a que el Laboratorio Costero se encuentra ubicado en una zona con falta de disposición de desechos, se empleará la solución de cloruro de sodio (NaCl) la cual es ambientalmente benigna, disponible y barata (Quinn *et al*., 2017). Sin embargo, solo los polímeros con una densidad menor a 1,2 $g.m^{-3}$ pueden flotar en esta solución (Anexo 2) (Quinn *et al*., 2017).

be recorded in sexagesimal units, referred to Datum WGS 84 (Annex 1). The extracted specimens of *U. occidentalis* and *A. tuberculosa* at each sampling point will be counted and then stored in a box with cotton for later analysis in the laboratory (Aguirre-Sánchez *et al*., 2022).

Laboratory analysis

With the use of a digital vernier, the width of the cephalothorax (AC) of each specimen will be measured; with a digital scale the total weight of the specimen will be made. The target tissues of the investigation will be dissected, weighed individually, and later, they will be covered in aluminum foil, labeled and coded appropriately for their preservation by freezing until analysis (Naji *et al*., 2018).

Separation by densities

Density separation is a technique used for the extraction of microplastics from sediment (Nakajima *et al*., 2019), this is done by shaking the sediment in a supersaturated solution (Thompson, 2015). Because the coastal laboratory is in an area with a lack of waste disposal, sodium chloride (NaCl) solution will be used, which is environmentally benign, available, and cheap (Quinn *et al*., 2017). However, only polymers with a density less than 1.2 gcm^{-3} can float in this solution (Annex 2) (Quinn *et al*., 2017).

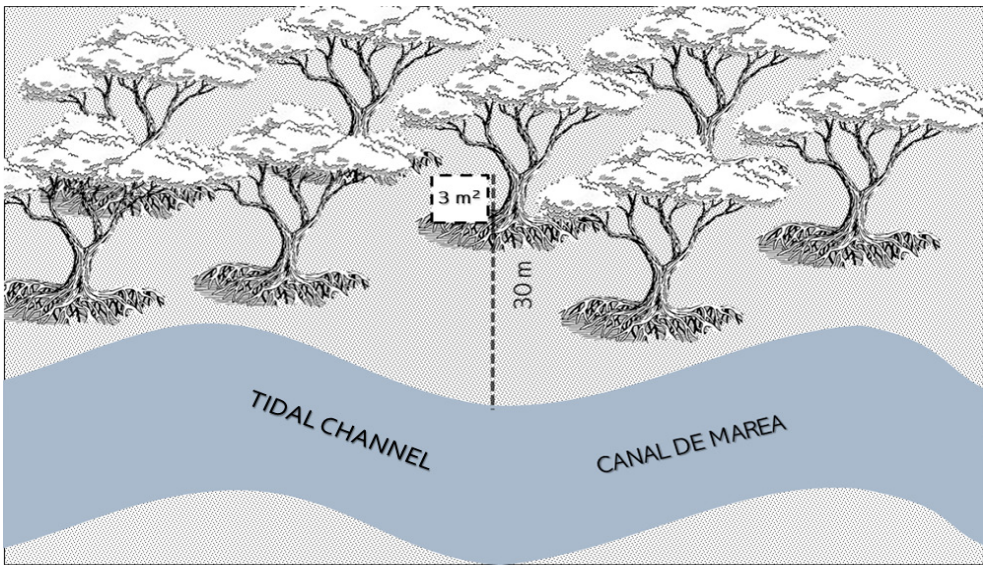


Figura 1.- Área de muestreo para la biota del ecosistema de manglar

Elaboración de la solución hipersalina. La solución hipersalina de NaCl se elaborará disolviendo la mayor cantidad de sal en agua destilada a punto de ebullición hasta hipersaturarla y alcanzar la densidad de 1,2 g.cm^{-3} (Figura 2), la solución se filtrará dos veces en una membrana de vidrio Whatman de 10 µm para remover las impurezas de la solución (Tabla 1) (Coppock *et al*., 2017). Esta será guardada en un envase de vidrio (1L) para su próximo uso. Usando la ecuación de Quinn *et al.* (2017), se asegura la saturación de la solución.

Preparation of the hypersaline solution. The hypersaline NaCl solution will be made by dissolving the largest amount of salt in distilled water at the boiling point until it is hypersaturated and reaches a density of 1.2 gcm^{-3} (Figure 2), the solution will be filtered twice through a Whatman glass membrane. of 10 µm to remove impurities from the solution (Table 1) (Coppock *et al*., 2017). This will be stored in a glass container (1L) for its next use. Using the equation of Quinn *et al*. (2017), the saturation of the solution was ensured.

$$Densidad = \frac{(peso\ del\ frasco\ con\ la\ solución\ (g) - Peso\ del\ frasco\ (g))}{Volumen\ del\ frasco\ (cm^3)}$$

$$Density = \frac{(weight\ of\ the\ bottle\ of\ solution\ \ (g)\ -\ jar\ weight\ (g))}{jar\ volume\ (cm^3)}$$

Tabla 1.- Cantidad de NaCl agregado con la densidad obtenida

Cantidad de NaCl (g)	Densidad lograda (gcm^{-3})
450	1,18

Figura 2.- Preparación de la solución hipersalina

Digestión de los tejidos blandos

Identificar presencia de microplásticos en los tejidos de la biota es un gran desafío, debido a que pueden estar enmascarados por material biológico, detritos, algas y adherencias microbianas (Lusher *et al*., 2017). El aislamiento de estos polímeros se puede realizar mediante la digestión de

Soft tissue digestion

Identifying the presence of microplastics present in biota tissues is a great challenge because it can be masked by biological material, debris, algae and microbial adhesions (Lusher *et al*., 2017). The isolation of these polymers can be performed by tissue digestion using oxidative

los tejidos utilizando métodos oxidantes (Lusher *et al*., 2017; Nuelle *et al*., 2014), ácidos (Claessens *et al*., 2013), alcalinos (Cole *et al.,* 2014; Dehaut *et al*., 2016) y enzimáticos (Cole *et al.,* 2014), dejando solo los elementos recalcitrantes (Lusher *et al.,* 2017).

Sin embargo, la selección de la metodología más apropiada debe estar de acuerdo a los objetivos del estudio y sin degradar los polímeros plásticos (Bessa *et al*., 2019). La base fuerte de hidróxido de potasio KOH 10% se utiliza para degradar material biológico, hidrolizando los enlaces químicos y desnaturalizando las proteínas (Jin *et al*., 2009). Actualmente, se emplea este método de digestión por ser el más eficiente con un menor grado de degradación de los polímeros, con un costo beneficio rentable en el tiempo (Lopes *et al*., 2022).

Por este motivo, la digestión de los tejidos blandos para los invertebrados se realizará siguiendo el Protocolo 1b de Dehaut *et al.* (2016) con modificaciones (Figura 3). Las muestras serán incubadas durante 48 horas, a 60 °C con 50 mL de KOH al 10% (w/v) (Aguirre-Sánchez *et al*., 2022). Posteriormente, se filtrará el sobrenadante en un filtro con un tamaño de poro menor a 5 mm.

Debido a la presencia de sedimento en las muestras de tejido, se procederá a realizar la separación por densidades, agregando el doble (25 mL) de solución hipersalina (1,18 g/mL de NaCl) en un tubo Falcon, agitándolo y dejándolo reposar entre 5 y 8 minutos (Paso 6, Fig. 3). Finalmente, se volverá a filtrar el sobrenadante en un filtro con tamaño de poro de 45 μm (Paso 7, Fig. 3). Inmediatamente se colocará el filtro en una placa Petri, sellada con una lámina transparente de olefina (Coppock *et al*., 2017).

Caracterización visual

Al finalizar la digestión del tejido blando, utilizando un estereoscopio, se realizará la clasificación descriptiva de los posibles microplásticos en dos categorías: morfología y propiedades ópticas (Lusher *et al*., 2020). Teniendo en cuenta la forma de los posibles microplásticos, la morfología será clasificada según Kovač Viršek *et al*. (2016) en: Fragmentos, Films, Pellets, Fibras o Filamentos, Tecnopor y Granulados o microperlas (Tabla 2, Fig. 4).

methods (Lusher *et al*., 2017; Nuelle *et al*., 2014), acid (Claessens *et al*., 2013), alkaline (Cole *et al*., 2014; Dehaut *et al*., 2016) and enzymatic (Cole *et al*., 2014), leaving only the recalcitrant elements (Lusher *et al*., 2017).

However, the selection of the most appropriate methodology must be chosen according to the objectives of the study and without degrading the plastic polymers (Bessa *et al*., 2019). Potassium hydroxide KOH 10% strong base is used to degrade biological material by hydrolyzing chemical bonds and denaturing proteins (Jin *et al*., 2009). Currently, this digestion method is used because it is the most efficient with a lower degree of degradation of the polymers with a cost-effective benefit over time (Lopes *et al*., 2022).

For this reason, soft tissue digestion for invertebrates will be performed following Protocol 1b of Dehaut *et al.* (2016) with modifications (Figure 3). The samples will be incubated for 48 hours at 60°C with 50 mL of 10% (w/v) KOH (Aguirre-Sánchez *et al*., 2022). Subsequently, the supernatant will be filtered through a filter with a pore size of less than 5 mm.

Due to the presence of sediment in the tissue samples, the separation by density will be carried out by adding double (25 mL) of hypersaline solution (1.18 g/mL of NaCl) in the same Falcon tube, shaking it and letting it settle between 5-8 minutes (Step 6-Fig. 3). Finally, the supernatant will be filtered again on a filter with a pore size of 45 μm (Step 7- Fig. 3). The filter will immediately be placed in a Petri dish sealed with Parafilm (Coppock *et al*., 2017).

Visual characterization

At the end of the digestion of the soft tissue, using a stereoscope, the descriptive classification of possible microplastics will be carried out into two categories: morphology and optical properties (Lusher *et al*., 2020). The morphology according to the shape of the possible microplastics will be classified according to Kovač Viršek *et al.* (2016) in: Fragments, Films, Pellets, Fibrers or Filaments, Foam and microbeads (Table 2, Figure 4).

Tabla 2.- Características de los tipos de microplásticos según su morfología

Clasificación según su morfología	Características
Película	Presentan forma irregular, son delgados, flexibles, planos.
Fibras / Filamentos	Presentan forma de hilo alargado, pueden ser de distintos colores.
Fragmentos	De forma irregular, rígidos y gruesos.
Gránulos	De un tamaño grande, planos por un lado y redondo por el otro.
Tecnopor	De color amarillento-blanquecino, tienen forma irregular con textura suave.
Microperla	Presentan una forma esférica simétrica, la mayoría de color transparente.

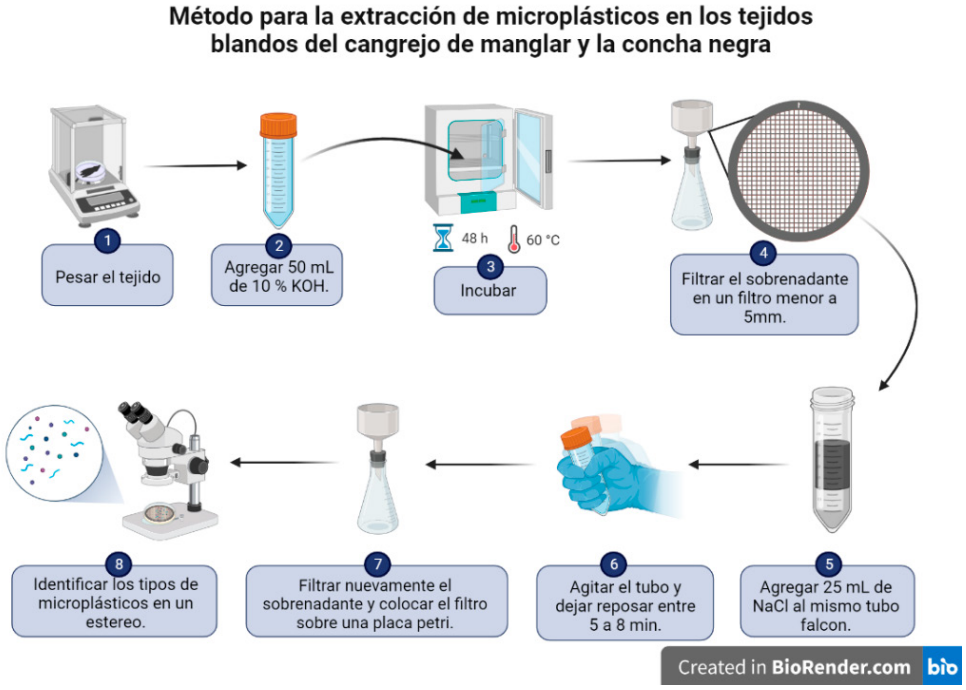


Figura 3.- Método para la extracción de microplásticos en los tejidos blandos del cangrejo de manglar (*Ucides occidentalis*) y concha negra (*Anadara tuberculosa*) (Elaborado con Biorender.com)

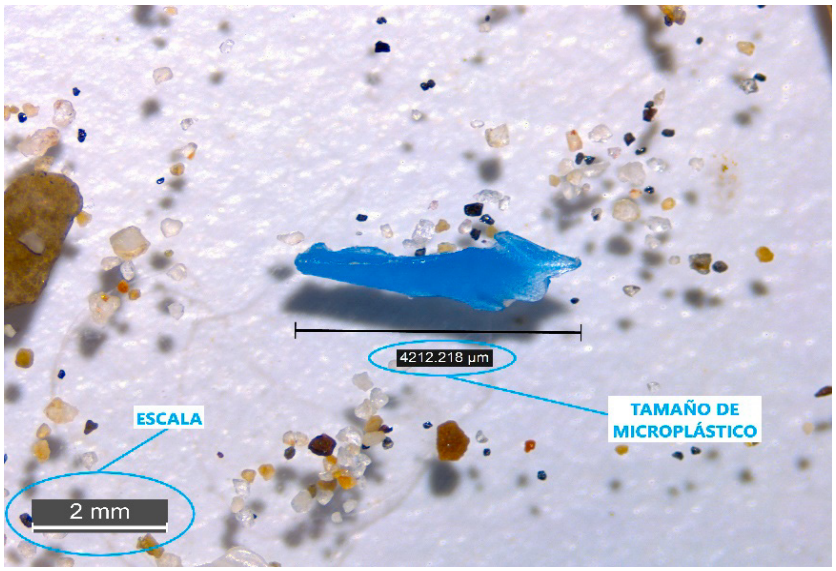


Figura 4.-Tipos de microplásticos según su morfología

La morfología según el tamaño, será calculada en micras (μm) a una escala de 25x mediante el programa Motic Images Plus 3.0 (Fig. 5). Debido al blanqueamiento de los polímeros durante el proceso de digestión con KOH (Bråte *et al.*, 2018), se emplearán los colores base para clasificar los rangos de tonos de una sola categoría en las propiedades ópticas (ejemplo: turquesa, celeste como azul) (Lusher *et al.*, 2020) (Anexo 4).

Se seleccionará una submuestra del 10% de los posibles microplásticos para su análisis mediante FT-IR (Infrarrojos por transformada de Fourier) (Stockin *et al.*, 2021).

En Microsoft Excel se recomienda anotar el código de la placa, tipo de microplástico, color y tamaño (Anexo 3). Cada registro fotográfico deberá incluir la escala en μm o mm.

3. CONCLUSIONES

La estandarización del protocolo para la digestión de tejidos blandos en los invertebrados *Ucides occidentalis* y *Anadara tuberculosa* es importante para el análisis de microplásticos en los manglares de la región de Tumbes.

Es necesario efectuar un muestreo continuo para evaluar la incidencia temporal de microplástico en este ecosistema tan importante.

Este protocolo, servirá para una identificación rápida y efectiva de los posibles microplásticos encontrados en los tejidos de ambas especies en laboratorios con escasa disposición de los insumos químicos.

4. RECOMENDACIONES

Durante el proceso de digestión de los tejidos se presentaron distintas dificultades por lo cual se estructuró la Tabla 3, en la que se encuentran las recomendaciones de procedimiento ante presencia de sedimento en los tejidos evaluados, gran cantidad de lípidos en los tejidos y ausencia de instalación para buena disposición de residuos en la zona donde se emplearán los químicos para la digestión.

On the other hand, the morphology according to the size will be calculated in microns (μm) at a 25x scale using the Motic Images Plus 3.0 program. (Figure 4). Due to the bleaching of the polymers during the KOH digestion process (Bråte *et al.*, 2018), the base colors will be used to classify the ranges of shades of a single category in the optical properties (example: turquoise, light blue or blue) (Lusher *et al.*, 2020) (Annex 4).

A subsample of 10% of the possible microplastics will be selected for analysis using FT-IR (Fourier Transform Infrared) (Stockin *et al.*, 2021).

It is recommended to write down in Microsoft Excel: the plate code, type of microplastic, color and size (Annex 3). Each photographic record must include the scale in μm or mm.

3. CONCLUSIONS

The standardization of the protocol for the digestion of soft tissues in the invertebrates *U. occidentalis* and *A. tuberculosa* is essential for the analysis of microplastics in the mangroves of the Tumbes region. Therefore, continuous sampling can be carried out to assess the incidence of microplastics over time in this important ecosystem.

Likewise, this protocol is ideal for a rapid and effective identification of possible microplastics found in the tissues of both species in coastal laboratories with little disposal of chemical residues.

4. RECOMENDATIONS

During the digestion process of the tissues, various difficulties arose, for which Table 3 was drawn up, which contains the recommendations given the difficulty of the presence of sediment in the evaluated tissues, a large amount of lipids in the tissues, and the absence of good waste disposal in the area where the chemicals will be used for digestion.

Tabla 3.- Recomendaciones para enfrentar dificultades encontradas durante los procesos

Proceso	Dificultad	Recomendación
Digestión de tejido blando	Presencia de sedimento en el tracto digestivo	Agregar solución de NaCl para la separación por densidades
Digestión de tejido blando	Saponificación al utilizar KOH con tejidos ricos en lípidos	Emplear la metodología realizada por Dawson *et al.* (2020)
Separación por densidades	Ausencia de una buena disposición de residuos	Emplear NaCl en vez de $ZnCl_2$

Se recomienda, que los investigadores adecúen el protocolo según la especie de invertebrado que estén investigando; asimismo, asociarse con laboratorios que realizan este tipo de investigación y que sean cercanos al área de muestreo, para disminuir la contaminación cruzada por microplásticos provenientes del aire.

Se recomienda, realizar cursos de capacitación a los ciudadanos donde se esté realizando el muestreo de microplásticos, compartiendo los resultados y este protocolo.

Agradecimientos

Extendemos nuestro agradecimiento a la Coordinadora del Laboratorio Costero de Imarpe Tumbes, Mg. Mervin Guevara por su apoyo al brindarnos las instalaciones del laboratorio para el proceso de las muestras. Asimismo, agradecemos al Dr. Matthew Cole y a la Dra. Pennie Lindeque por sus consejos para la elaboración del presente protocolo replicable en la región de Tumbes.

Researchers are recommended to adapt the protocol according to the species of invertebrates they are investigating; Likewise, it is recommended to associate with laboratories that carry out this type of research and that are close to the sampling area to reduce cross-contamination by airborne microplastics.

Likewise, it is recommended to carry out training courses for citizens where the sampling of microplastics is being carried out, sharing the results and the present protocol.

Acknowledgments

We extend our gratitude to the coordinator of the Imarpe Tumbes coastal laboratory, Mg. Mervin Guevara for her support in providing us with the laboratory facilities to process the samples. Likewise, we thank Dr. Matthew Cole and Dr. Pennie Lindeque for their advice for the development of this replicable protocol in the Tumbes region.

5. REFERENCIAS

Aguirre-Sánchez, A., Purca, S. & Indacochea, A. G. (2022). Microplastic presence in the mangrove crab *Ucides occidentalis* (Brachyura: Ocypodidae) (Ortmann, 1897) derived from local markets in Tumbes, Peru. *Air, Soil and Water Research*, *15*, *1-12*. https://doi.org/10.1177/11786221221124549

Akdogan, Z. & Guven, B. (2019). Microplastics in the environment: A critical review of current understanding and identification of future research needs. *Environmental Pollution*, *254*(A), 113011. https://doi.org/10.1016/j.envpol.2019.113011

Aldana-Gutiérrez, G., Ruiz-Fernández, A. C., Pérez-Bernal, L. H., Flores-Verdugo, F., Cuellar-Martínez, T. & Sanchez-Cabeza, J. A. (2021). Flujos e inventarios de carbono azul en manglares asociados a una laguna costera antropizada. *Geofísica Internacional*, *60*(1), 13–30. https://doi.org/10.22201/igeof.00167169p.2021.60.1.2011

Angulo, F. (2014). Los Manglares del Perú. *Xilema*, 27, 5-9.

Azabache Cobeña, J. M. F. (2016). *Cadena productiva de* Anadara tuberculosa *(Sowerby 1833) extraída en el Santuario Nacional de los Manglares de Tumbes, 2015*. [Tesis de Licenciatura, Universidad Nacional de Tumbes]. Repositorio IGP. https://repositorio.igp.gob.pe//handle/20.500.12816/960

Bessa, F., Frias, J., Kögel, T., Lusher, A., Andrade, J. M., Antunes, J., Sobral, P., Pagter, E., Nash, R., O'Connor, I., Pedrotti, M. L., Kerros, M. E., León, V., Tirelli, V., Suaria, G., Lopes, C., Raimundo, J., Caetano, M., Gago, J., … Gerdts, G. (2019). *Harmonized protocol for monitoring microplastics in biota. Deliverable 4.3.* [Reporte]. JPI-Oceans BASEMAN Project. https://doi.org/10.13140/RG.2.2.28588.72321/1

Brander, S. M., Renick, V. C., Foley, M. M., Steele, C., Woo, M., Lusher, A., Carr, S., Helm, P., Box, C., Cherniak, S., Andrews, R. C. & Rochman, C. M. (2020). Sampling and Quality Assurance and Quality Control: A Guide for Scientists Investigating the Occurrence of Microplastics Across Matrices. *Applied Spectroscopy*, *74*(9), 1099-1125. https://doi.org/10.1177/0003702820945713

Bråte, I. L. N., Hurley, R., Iversen, K., Beyer, J., Thomas, K. V., Steindal, C. C., Green, N. W., Olsen, M. & Lusher, A. (2018). *Mytilus* spp. as sentinels for monitoring microplastic pollution in Norwegian coastal waters: A qualitative and quantitative study. *Environmental Pollution*, *243*(Pt A), 383-393. https://doi.org/10.1016/j.envpol.2018.08.077

Claessens, M., Van Cauwenberghe, L., Vandegehuchte, M. B. & Janssen, C. R. (2013). New techniques for the detection of microplastics in sediments and field collected organisms. *Marine Pollution Bulletin*, *70*, 227-233. https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2013.03.009

Cole, M., Webb, H., Lindeque, P. K., Fileman, E. S., Halsband, C. & Galloway, T. S. (2014). Isolation of microplastics in biota-rich seawater samples and marine organisms. *Scientific Reports*, *4*, *4528*. https://doi.org/10.1038/srep04528

Coppock, R. L., Cole, M., Lindeque, P. K., Queirós, A. M. & Galloway, T. S. (2017). A small-scale, portable method for extracting microplastics from marine sediments. *Environmental Pollution*, *230*, 829-837. https://doi.org/10.1016/j.envpol.2017.07.017

Crawford, C. B. & Quinn, B. (2017). *Microplastic Pollutants*. Elsevier Inc. https://doi.org/10.1016/C2015-0-04315-5

Dawson, A. L., Motti, C. A. & Kroon, F. J. (2020). Solving a Sticky Situation: Microplastic Analysis of Lipid-Rich Tissue. *Frontiers in Environmental Science*, *8*, *563565*. https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fenvs.2020.563565

Dehaut, A., Cassone, A.-L., Frère, L., Hermabessiere, L., Himber, C., Rinnert, E., Rivière, G., Lambert, C., Soudant, P., Huvet, A., Duflos, G. & Paul-Pont, I. (2016). Microplastics in seafood: Benchmark protocol for their extraction and characterization. *Environmental Pollution*, *215*, 223-233. https://doi.org/10.1016/j.envpol.2016.05.018

Ding, J., Sun, Y., He, C., Li, J., & Li, F. (2022). Towards Risk Assessments of Microplastics in Bivalve Mollusks Globally. *Journal of Marine Science and Engineering*, *10*(2), 288. https://doi.org/10.3390/jmse10020288

Ding, J., Sun, C., He, C., Li, J., Ju, P. & Li, F. (2021). Microplastics in four bivalve species and basis for using bivalves as bioindicators of microplastic pollution. *Science of The Total Environment*, *782*, 146830. https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2021.146830

Do, A. T. N., Ha, Y. & Kwon, J.-H. (2022). Leaching of microplastic-associated additives in aquatic environments: A critical review. *Environmental Pollution*, *305*, 119258. https://doi.org/10.1016/j.envpol.2022.119258

Espinoza-Diaz, L. F. (2020). Prevalence of microplastic contamination in the digestive tract of fishes from magrove ecosystem in Cispata, Colombian Caribbean. *Marine Pollution Bulletin*, *154*, 111085. https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2020.111085

Frias, J., Filgueiras, A., Gago, J., Pedrotti, M. L., Suaria, G., Tirelli, V., Andrade, J., Nash, R., O'Connor, I., Lopes, C., Caetano, M., Raimundo, J., Carretero, O., Viñas, L., Antunes, J., Bessa, F., Sobral, P., Goruppi, A., Aliani, S. & Gerdts, G. (2019). *Standardised protocol for monitoring microplastics in seawater*. JPI-Oceans, BASEMANproject. http://dx.doi.org/10.13140/RG.2.2.14181.45282

Garcés-Ordóñez, O., Mejía-Esquivia, K. A., Sierra-Labastidas, T., Patiño, A., Blandón, L. M. & Espinoza-Díaz, L. F. (2020). Prevalence of microplastic contamination in the digestive tract of fishes from mangrove ecosystem in Cispata, Colombian Caribbean. *Marine Pollution Bulletin*, *154*, 111085. https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2020.111085

Hodkovicova, N., Hollerova, A., Svobodova, Z., Faldyna, M. & Faggio, C. (2022). Effects of plastic particles on aquatic invertebrates and fish - A review. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, *96*, 104013. https://doi.org/10.1016/j.etap.2022.104013

Imhof, H. K., Laforsch, C., Wiesheu, A. C., Schmid, J., Anger, P. M., Niessner, R. & Ivleva, N. P. (2016). Pigments and plastic in limnetic ecosystems: A qualitative and quantitative study on microparticles of different size classes. *Water Research*, *98*, 64-74. https://doi.org/10.1016/j.watres.2016.03.015

Jin, Y., Li, H., Mahar, R. B., Wang, Z. & Nie, Y. (2009). Combined alkaline and ultrasonic pretreatment of sludge before aerobic digestion. *Journal of Environmental Sciences*, *21*(3), 279-284. https://doi.org/10.1016/S1001-0742(08)62264-0

John, J., Nandhini, A. R., Velayudhaperumal Chellam, P. & Sillanpää, M. (2022). Microplastics in mangroves and coral reef ecosystems: A review. *Environmental Chemistry Letters*, *20*(1), 397-416. https://doi.org/10.1007/s10311-021-01326-4

Kovač Viršek, M., Palatinus, A., Koren, Š., Peterlin, M., Horvat, P. & Kržan, A. (2016). Protocol for Microplastics Sampling on the Sea Surface and Sample Analysis. *Journal of Visualized Experiments : JoVE*, *118*, 55161. https://doi.org/10.3791/55161

Kwan, C. S. & Takada, H. (2016). Release of Additives and Monomers from Plastic Wastes. En H. Takada & H. K. Karapanagioti (Eds.), *Hazardous Chemicals Associated with Plastics in the Marine Environment* (pp. 51-70). Springer International Publishing. https://doi.org/10.1007/698_2016_122

Lehtiniemi, M., Hartikainen, S., Näkki, P., Engström-Öst, J., Koistinen, A. & Setälä, O. (2018). Size matters more than shape: Ingestion of primary and secondary microplastics by small predators. *Food Webs*, *17*, e00097. https://doi.org/10.1016/j.fooweb.2018.e00097

Li, R., Zhang, S., Zhang, L., Yu, K., Wang, S. & Wang, Y. (2020). Field study of the microplastic pollution in sea snails (*Ellobium chinense*) from mangrove forest and their relationships with microplastics in water/sediment located on the north of Beibu Gulf. *Environmental Pollution*, *263*(Pt B), 114368. https://doi.org/10.1016/j.envpol.2020.114368

Lopes, C., Fernández-González, V., Muniategui-Lorenzo, S., Caetano, M. & Raimundo, J. (2022). Improved methodology for microplastic extraction from gastrointestinal tracts of fat fish species. *Marine Pollution Bulletin*, *181*, 113911. https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2022.113911

Lusher, A. L., Bråte, I. L. N., Munno, K., Hurley, R. R. & Welden, N. A. (2020). Is It or Isn't It: The

Importance of Visual Classification in Microplastic Characterization. *Applied Spectroscopy*, *74*(9), 1139-1153. https://doi.org/10.1177/0003702820930733

Lusher, A. L., Hurley, R., Vogelsang, C., Nizzetto, L. & Olsen, M. (2017). *Mapping microplastics in sludge* (NIVA-rapport 7215). Norsk institutt for vannforskning. http://hdl.handle.net/11250/2493527

Maghsodian, Z., Sanati, A. M., Tahmasebi, S., Shahriari, M. H. & Ramavandi, B. (2022). Study of microplastics pollution in sediments and organisms in mangrove forests: A review. *Environmental Research*, *208*, 112725. https://doi.org/10.1016/j.envres.2022.112725

Martínez Grimaldo de Takahashi, A. G. (2021). *Relaciones sociales de poder y desarrollo territorial en la creación de áreas naturales protegidas: Caso del Santuario Nacional Los Manglares de Tumbes (SNLMT)* [Tesis de Doctorado, Pontificia Universidad Católica del Perú]. Repositorio PUCP. http://hdl.handle.net/20.500.12404/18668

Naji, A., Nuri, M., & Vethaak, A. D. (2018). Microplastics contamination in molluscs from the northern part of the Persian Gulf. *Environmental Pollution*, *235*, 113-120. https://doi.org/10.1016/j.envpol.2017.12.046

Nakajima, R., Tsuchiya, M., Lindsay, D. J., Kitahashi, T., Fujikura, K., & Fukushima, T. (2019). A new small device made of glass for separating microplastics from marine and freshwater sediments. *PeerJ*, *7*, e7915. https://doi.org/10.7717/peerj.7915

Nuelle, M.-T., Dekiff, J. H., Remy, D. & Fries, E. (2014). A new analytical approach for monitoring microplastics in marine sediments. *Environmental Pollution*, *184*, 161-169. https://doi.org/10.1016/j.envpol.2013.07.027

Ordinola Zapata, E. (2022). Pesquería de invertebrados marinos y de manglar, Tumbes, Perú, 2018. *Inf Inst Mar Perú, 49*(1), 5-32. https://hdl.handle.net/20.500.12958/4050

Ordinola, E., Montero, P., Aleman, S. & Llanos, J. (2010). El cangrejo de los manglares *Ucides occidentalis* (Ortman) en Tumbes, Perú. Primavera 2007. *Inf Inst Mar Perú, 37*(3-4), 151-159. https://hdl.handle.net/20.500.12958/2017

Pfeiffer, F. & Fischer, E. K. (2020). Various Digestion Protocols Within Microplastic Sample Processing—Evaluating the Resistance of Different Synthetic Polymers and the Efficiency of Biogenic Organic Matter Destruction. *Frontiers in Environmental Science*, *8, 572424*. https://doi.org/10.3389/fenvs.2020.572424

Prata, J. C., Reis, V., da Costa, J. P., Mouneyrac, C., Duarte, A. C. & Rocha-Santos, T. (2021). Contamination issues as a challenge in quality control and quality assurance in microplastics analytics. *Journal of Hazardous Materials*, *403*, 123660. https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2020.123660

Quinn, B., Murphy, F. & Ewins, C. (2017). Validation of density separation for the rapid recovery of microplastics from sediment. *Analytical Methods*, *9*, 1491-1498. https://doi.org/10.1039/C6AY02542K

Sasmito, S. D., Taillardat, P., Clendenning, J. N., Cameron, C., Friess, D. A., Murdiyarso, D. & Hutley, L. B. (2019). Effect of land-use and land-cover change on mangrove blue carbon: A systematic review. *Global Change Biology*, *25*(12), 4291-4302. https://doi.org/10.1111/gcb.14774

Schrank, I., Möller, J. N., Imhof, H. K., Hauenstein, O., Zielke, F., Agarwal, S., Löder, M. G. J., Greiner, A. & Laforsch, C. (2022). Microplastic sample purification methods—Assessing detrimental effects of purification procedures on specific plastic types. *Science of The Total Environment*, *833*, 154824. https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2022.154824

Sridharan, S., Kumar, M., Singh, L., Bolan, N. S. & Saha, M. (2021). Microplastics as an emerging source of particulate air pollution: A critical review. *Journal of Hazardous Materials*, *418*, 126245. https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2021.126245

Stockin, K. A., Pantos, O., Betty, E. L., Pawley, M. D. M., Doake, F., Masterton, H., Palmer, E. I., Perrott, M. R., Nelms, S. E. & Machovsky-Capuska, G. E. (2021). Fourier transform infrared (FTIR) analysis identifies microplastics in stranded common dolphins (*Delphinus delphis*) from New Zealand waters. *Marine Pollution Bulletin*, *173*, 113084. https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2021.113084

Tagg, A. S., Harrison, J. P., Ju-Nam, Y., Sapp, M., Bradley, E. L., Sinclair, C. J. & Ojeda, J. J. (2017). Fenton's reagent for the rapid and efficient isolation of microplastics from wastewater. *Chemical Communications*, *53*(2), 372-375. https://doi.org/10.1039/C6CC08798A

Thompson, R. C. (2015). Microplastics in the Marine Environment: Sources, Consequences and Solutions. En M. Bergmann, L. Gutow, & M. Klages (Eds.), *Marine Anthropogenic Litter* (pp. 185-200). Springer International Publishing. https://doi.org/10.1007/978-3-319-16510-3_7

Verla, A. W., Enyoh, C. E., Verla, E. N. & Nwarnorh, K. O. (2019). Microplastic–toxic chemical interaction: A review study on quantified levels, mechanism and implication. *SN Applied Sciences*, *1*, 1400. https://doi.org/10.1007/s42452-019-1352-0

Wang, R., Mou, H., Lin, X., Zhu, H., Li, B., Wang, J., Junaid, M. & Wang, J. (2021). Microplastics in Mollusks: Research Progress, Current Contamination Status, Analysis Approaches, and Future Perspectives. *Frontiers in Marine Science*, *8, 759919*. https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fmars.2021.759919

Wang, Y., Jiao, M., Li, T., Li, R. & Liu, B. (2023). Role of mangrove forest in interception of microplastics (MPs): Challenges, progress, and prospects. *Journal of Hazardous Materials*, *445*, 130636. https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2022.130636

Watts, A. J. R., Lewis, C., Goodhead, R. M., Beckett, S. J., Moger, J., Tyler, C. R. & Galloway, T. S. (2014). Uptake and Retention of Microplastics by the Shore Crab Carcinus maenas. *Environmental Science & Technology*, *48*(15), 8823-8830. https://doi.org/10.1021/es501090e

Zeenat, Elahi, A., Bukhari, D. A., Shamim, S. & Rehman, A. (2021). Plastics degradation by microbes: A sustainable approach. *Journal of King Saud University - Science*, *33*(6), 101538. https://doi.org/10.1016/j.jksus.2021.101538

Zhang, L., Wang, S., Jian, Q., Zhang, P., Lu, Y., & Liu, H. (2022). Tidal variation shaped microplastic enrichment patterns in mangrove blue carbon ecosystem of northern Beibu Gulf, China. *Frontiers in Marine Science*, *9*, *927884*. https://doi.org/10.3389/fmars.2022.927884

Zhang, L., Zhang, S., Guo, J., Yu, K., Wang, Y. & Li, R. (2020). Dynamic distribution of microplastics in mangrove sediments in Beibu Gulf, South China: Implications of tidal current velocity and tidal range. *Journal of Hazardous Materials*, *399*, 122849. https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2020.122849

Zhang, T., Sun, Y., Song, K., Du, W., Huang, W., Gu, Z. & Feng, Z. (2021). Microplastics in different tissues of wild crabs at three important fishing grounds in China. *Chemosphere*, *271*, 129479. https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2020.129479

ANEXOS

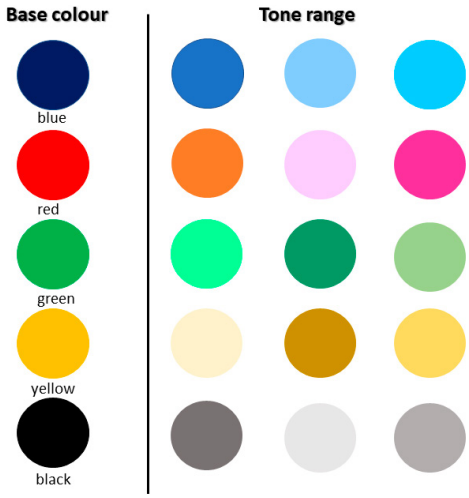
Anexo 1.- Hoja de muestreo

Código de muestra	Lugar	Hora de inicio	Hora final	Latitud	Longitud	Ancho del cefalotorax (AC)	Peso total (g)	Peso tejido (g)

Anexo 2.- Tabla de densidad de los polímeros según Frias *et al*. (2019)

Abreviatura	Polymer	Densidad (g cm^{-3})
PS	Polystyrene	0,01-1,06
PP	Polypropylene	0,85-0,92
LDPE	Low-density polyethylene	0,89-0,93
EVA	Ethylene vinyl acetate	0,93-0,95
HPDE	High-density polyethylene	0,94-0,98
PA	Polyamide	1,12-1,15
PA 6,6	Nylon 6,6	1,13-1,15
PMMA	Poly methyl methacrylate	1,16-1,20
PC	Polycarbonate	1,20-1,22
PU	Polyurethane	1,20-1,22

Anexo 3.- Ejemplo de hoja de registro

Código de muestra	Lugar	Tipo	Color	Tamaño (m)	Notas

Anexo 4.- Colores base y sus rangos de tonos