



Universidad
Zaragoza



Facultad de Ciencias
Universidad Zaragoza

DETECCIÓN Y CARACTERIZACIÓN POR TAMAÑOS DE MICRO Y NANOPLÁSTICOS EN MUESTRAS DE INTERÉS AMBIENTAL

Trabajo Fin de Grado

Sergio Calvo Anglada

Director: Eduardo Bolea Morales

Departamento de Química Analítica, Universidad de Zaragoza

Grupo de Espectroscopia Analítica y Sensores (GEAS)



Julio 2020

A mi madre, por estar siempre a mi lado,
apoyándome, enseñándome y
demostrándome que con esfuerzo y
constancia todo se consigue

A mis abuelos, Jesús y M^a Jesús, por darme
tanto, y seguir protegiéndome.
Siempre estáis conmigo

A mis compañeros y amigos, por compartir
tantas vivencias, y darme fuerza
en los momentos más duros

A Eduardo, por compartir sus conocimientos,
guiarme y aconsejarme durante
este Trabajo Fin de Grado

RESUMEN

El uso indiscriminado de plásticos, conlleva a que la mayoría acaben en la naturaleza, donde son capaces de degradarse, creando partículas muy pequeñas, los microplásticos, y a su vez formando nanoplásticos, lo que los hace cada vez más peligrosos, tanto para la salud humana y animal como para la propia naturaleza. Por ello es necesario disponer de metodologías analíticas para su detección, identificación y cuantificación.

Este trabajo ha consistido en primer lugar, en recopilar información de actualidad relacionada con las distintas técnicas y procedimientos que existen para la preconcentración, aislamiento, separación, identificación y caracterización de micro- y nanoplásticos, así como nuevas técnicas o estrategias que pueden ser prometedoras en un futuro próximo, profundizando en la técnica de fraccionamiento en flujo mediante campo de flujo asimétrico (AF4).

En segundo lugar, se ha realizado un estudio sobre el procedimiento experimental óptimo para la identificación de micro- y nanoplásticos (empleando partículas de poliestireno) mediante la tinción con Rojo Nilo (tinte orgánico) para su posterior detección mediante fluorescencia molecular y EAM UV-vis. Demostrando que puede ser una estrategia útil para la detección y caracterización por tamaños de nanoplásticos en análisis de rutina.

ABSTRACT

The indiscriminate use of plastics leads to most of them ending up in nature, where they are capable of degrading, creating very small particles, the microplastics, and in turn forming nanoplastics, which makes them increasingly dangerous, both for human and animal health and for nature itself. Therefore, it is necessary to have analytical methodologies for their detection, identification and quantification.

This work has consisted first of all in gathering current information related to the different techniques and procedures that exist for the pre-concentration, isolation, separation, identification and characterization of micro- and nanoplastics, as well as new techniques or strategies that may be promising in the near future, deepening the technique of asymmetrical flow field flow fractionation (AF4).

Secondly, a study has been carried out on the optimum experimental procedure for the identification of micro- and nanoplastics (using polystyrene particles) by means of Nile Red staining (organic dye) for their subsequent detection by molecular fluorescence and EAM UV-vis. Demonstrating that it can be a useful strategy for the detection and size characterization of nanoplastics in routine analysis.

Índice

1. INTRODUCCIÓN	1
1.1 Definición de micro- y nanoplásticos. Presencia en el medio ambiente	1
1.2 Técnicas y procedimientos más habituales para su detección	2
1.2.1 Preconcentración	2
1.2.2 Separación	4
1.2.3 Técnicas de identificación y caracterización	6
1.3 Identificación mediante tinción con Rojo Nilo	9
1.4 Técnicas basadas en el fraccionamiento en flujo mediante campo de flujo asimétrico (AF4) para la detección de nanoplásticos	9
2. OBJETIVOS	11
3. PARTE EXPERIMENTAL	12
3.1 Instrumentación y reactivos	12
3.1.1 Instrumentación	12
3.1.2 Aparatos, material y reactivos	12
3.2 Procedimientos	12
3.2.1 Tinción de Rojo Nilo sobre micropartículas de poliestireno (PS)	13
3.2.2 Preparación de disoluciones para su medición mediante fluorescencia molecular	13
3.2.3 Preparación de disoluciones para estudiar el efecto Quenching	14
3.2.4 Aislamiento de las partículas teñidas con Rojo Nilo	14
3.2.5 Preparación de disoluciones para estudiar el efecto tamaño/superficie	15
3.2.6 Preparación de disoluciones para estudiar la relación intensidad/ concentraciones de partículas	16
4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	16
4.1 Ensayos previos de tinción sobre micropartículas de poliestireno	16
4.2 Optimización del procedimiento de tinción para su medición mediante fluorescencia molecular	17
4.3 Efecto Quenching del disolvente sobre la fluorescencia del RN adsorbido sobre micropartículas de PS	18
4.4 Estrategias para el aislamiento de las micropartículas	20
4.5 Efecto del tamaño/superficie de las partículas de PS sobre su detección	22
4.6 Estudio de la relación intensidad/concentración de partículas	23
5 CONCLUSIONES	25
BIBLIOGRAFÍA	26
ANEXO	28

1. INTRODUCCIÓN

1.1 Definición de micro- y nanoplásticos. Presencia en el medio ambiente.

No es una novedad que los plásticos llegaron para quedarse, pero no de la forma que esperábamos. Los plásticos son baratos, ligeros y duraderos, lo que los hace útiles en una amplia gama de aplicaciones ¹, muchos de ellos son de un solo uso, generando residuos plásticos que terminan siendo perjudiciales para el medio ambiente. A diferencia de algunos otros contaminantes químicos, no podemos dejar de usarlos fácilmente ².

Esta basura plástica ha atraído la atención de la comunidad científica, de los organismos públicos y de la población, debido a la gigantesca cantidad de plásticos producidos y que entran en nuestro entorno cada año ³. Inicialmente se vio como un problema estético, pero pronto se observó la muerte de animales acuáticos y aves como resultado del enredo y la ingestión de restos de plástico ². Como consecuencia, el número de publicaciones sobre este tema ha aumentado sustancialmente de solo 5 en 2010 a más de 850 en 2019 ⁴.

Cuando llegan al medio ambiente, los plásticos sufren procesos de meteorización abiótica (Ej: *foto-oxidación por radiación UV, abrasión química por la arena y las olas del mar, etc.*) y biótica (Ej: *degradación biológica por organismos, etc.*) que causan su degradación y fragmentación en partículas cada vez más pequeñas, comúnmente denominadas microplásticos (MP) ¹, termino generalizado cuando el tamaño es inferior a 5mm ⁵. A su vez, los nanoplásticos (NP) pueden formarse tanto a partir de la degradación de microplásticos envejecidos, como en el proceso de fabricación, e incluso durante el uso de objetos de plástico ⁶.

Sin embargo, en la literatura de las ciencias ambientales hay un debate en cuanto a la definición de “nanoplástico” y su rango de tamaño, con tamaños de 1-100nm generalmente asignados a los nanoplásticos diseñados intencionalmente, y un rango de 1-1000nm asignados a los nanomateriales plásticos resultantes de la degradación y descomposición de microplásticos envejecidos ⁷.

La generación masiva de estos nuevos contaminantes, no solo conlleva riesgos en sistemas ecológicos en organismos acuáticos o animales, sino también en la salud humana, a través de la cadena alimentaria ⁸. Los nanoplásticos son tóxicos para los seres humanos, produciendo alteraciones de la membrana celular de las vellosidades intestinales, así como la liberación y la amplia distribución de los aditivos químicos en todo el cuerpo ⁷. Además, por sus diferentes tamaños y formas, proporcionan diferentes superficies para la deposición de contaminantes ⁸.

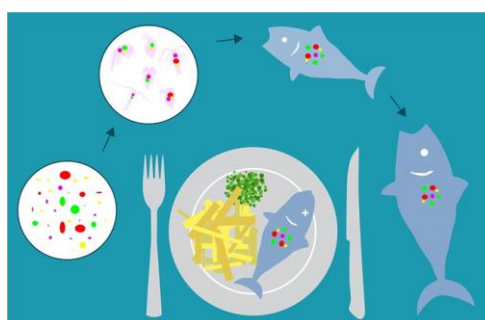


Figura 1 - Esquema de cómo afectan los micro- y nanoplásticos a la salud humana, a través de la cadena alimentaria.

Por tanto, el análisis ambiental requiere de métodos rápidos y económicos que puedan manejar un gran número de muestras, a fin de facilitar la evaluación de la contaminación y la evaluación de los riesgos ⁹, y así poder afrontar este nuevo desafío.

1.2 Técnicas y procedimientos más habituales para su detección

1.2.1 Preconcentración

Aunque hay grandes cantidades de contaminación plástica en el medioambiente, la masa de los micro- y nanoplásticos es probablemente muy baja. Por tanto, para la mayoría de los tipos de muestra, un paso de preconcentración es inevitable⁹. Las técnicas más comunes para el análisis de micro y nanoplásticos se basan en la separación con el uso de filtro o centrifugadora o por densidad. La técnica elegida depende del tipo de matriz y del tamaño de las partículas. Cuanto menor sea el tamaño de las partículas, más difícil será separarlas de la matriz⁴.

Por centrifugación

Es una técnica simple y fácil, que emplea la fuerza gravitacional mediante la centrifugación de la muestra, muy atractiva para el aislamiento de nanopartículas⁴.

Una variante es la **ultracentrifugación (UC)** que emplea fuerzas centrifugas superiores, necesarias para afectar al plástico más pequeño, que trae la dificultad inherente de las densidades similares a la del agua. El principal inconveniente, es que esta técnica procesa volúmenes de muestra más pequeños, en el rango de 10-100ml⁹. Además las altas fuerzas centrifugas o la tensión de la redistribución de las partículas, puede alterar la muestra formando agregados o dañando las partículas de plástico⁹.

También hay otra variante llamada **ultracentrifugación analítica (AUC)** que de forma espectroscópica (absorción de luz) monitoriza la sedimentación durante el proceso de centrifugación, de la cual se pueden derivar muchos parámetros sobre la morfología e información espectroscópica del polímero⁹.

Por densidad

Es un procedimiento simple para la separación principalmente de microplásticos, pero también se puede para nanoplásticos en muestras ambientales, empleando soluciones salinas saturadas (NaCl, NaI, ZnCl, ZnBr₂). La densidad de los polímeros varía entre 0,8 y 1,7 g/cm³, y la densidad de muestras, como sedimentos, superan los 2,6 g/cm³, permitiendo así la separación de los plásticos por flotación y separación del sobrenadante⁴.

Por filtración

Se basan en membranas y es una de las técnicas más utilizadas para el aislamiento de plásticos en muestras ambientales (principalmente en agua)⁴ debido a su fácil manejo, alta eficiencia y factores de enriquecimiento deseables. Existen filtros de membrana de diferentes materiales (Ej: óxido de aluminio, cerámica o policarbonato)⁹ y están disponibles en diferentes tamaños de poros (desde varios μm hasta decenas de nm) permitiendo el fraccionamiento de nanoplásticos de diferentes tamaños¹⁰. Hay que tener en cuenta que el uso de membranas poliméricas podrían introducir la contaminación plástica en la muestra⁹, por lo que no se recomienda su uso.

Una de las principales ventajas es que el tamaño y la morfología de los NP se mantienen, permitiendo una mayor identificación y cuantificación. Sin embargo, cuando el tamaño es inferior al rango de nm, el ensuciamiento de la membrana ralentiza el proceso de filtración, y el posible daño a la estructura de los poros, hace que el volumen válido de las muestras que pueden filtrarse disminuya en gran medida¹⁰. Aplicar una presión puede facilitar el flujo filtrado, y así aumentar la velocidad de extracción⁴. Esto debe ser considerado cuando se decida un protocolo de tratamiento para un gran volumen de muestras, especialmente cuando se planifica para muestras medioambientales, que pueden contener altas cantidades de contenido orgánico en relación con las partículas plásticas⁹.

En muestras con diferentes tipos de partículas en suspensión se pueden realizar **filtraciones secuenciales**, y así separar las partículas por rangos de tamaño⁴. Con cinco pasos de tamaños de poros de 25mm, 2,5mm, 0,45mm y dos veces 0,1mm (Figura 2), se ha logrado el aislamiento de nanoplasticos, evitando además una rápida obstrucción de los poros⁹.

Otro método notable es la **ultrafiltración (UF)** que permite la preconcentración, separación y purificación de los NP al mismo tiempo. Consiste en aplicar una fuerza hidrostática sobre una membrana nanoporosa, para aligerar el aislamiento de la suspensión de partículas¹⁰. Estas membranas nanoporosas tienen un corte de peso molecular en el rango de 10-100kDa (aproximadamente 5-50nm)⁹.

Se utiliza, ya sea en una célula agitada, en un campo centrífugo o en modo de flujo cruzado. Este último se ha empleado como preconcentración para el fraccionamiento en flujo mediante campo de flujo asimétrico (AF4) con partículas de poliestireno (PS) en el rango de 50-1000nm⁹.

Tras la ultrafiltración, se retiene un pequeño volumen del disolvente, lo que facilita la recogida de partículas y reduce en gran medida la pérdida de muestra y la alteración o agregación de partículas¹⁰. Esto indica que la UF de flujo cruzado es un método con un alto potencial para el procesamiento de muestras ambientales, siendo capaz de procesar grandes volúmenes de agua⁹.

Cribado

Técnica sencilla que emplea tamices con tamaños de malla decreciente para separar partículas de un tamaño mínimo de 10µm. Suele emplearse en análisis de rutina, como una separación previa antes de emplear otra técnica de separación⁴.

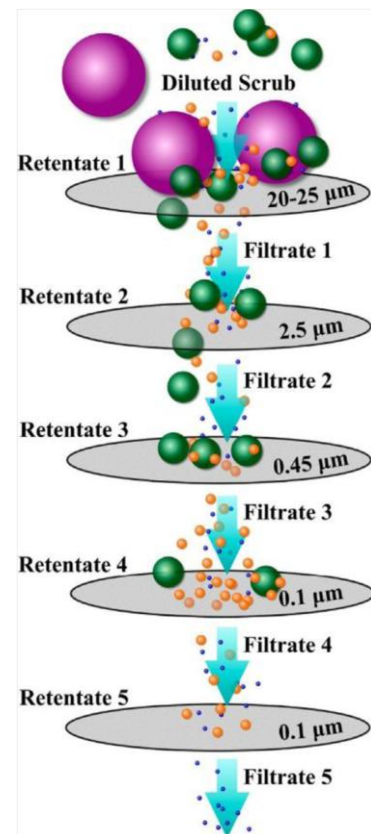


Figura 2 - Esquema del proceso de filtración secuencial. Referencia (Hernandez et al 2007)

1.2.2 Separación

Como técnicas de separación se podrían incluir algunas de las comentadas en el apartado anterior, como pueden ser la filtración secuencial y la ultrafiltración.

Fraccionamiento en flujo mediante campos (FFF)

Es un método basado en someter a las partículas a una fuerza de campo ortogonal a la dirección del flujo laminar en un canal estrecho (100-500 μm)⁴. Dependiendo de su difusividad, que está determinada por características como la densidad o forma⁹, las partículas de diferentes tamaños se separan en una columna de flujo cromatográfica pero sin fase estacionaria⁴. Debido a la fuerza del campo ejercido sobre el soluto, el flujo sufre una estratificación y forma diferentes espesores de capas de soluto⁸, como se observa en la Figura 3. Al no funcionar con una fase estacionaria, impide las interacciones con las partículas, sin embargo, las interacciones con la membrana del canal de flujo son un problema común, que debe ser contrarrestado mediante la optimización de un método adecuado para cada muestra individual⁹.

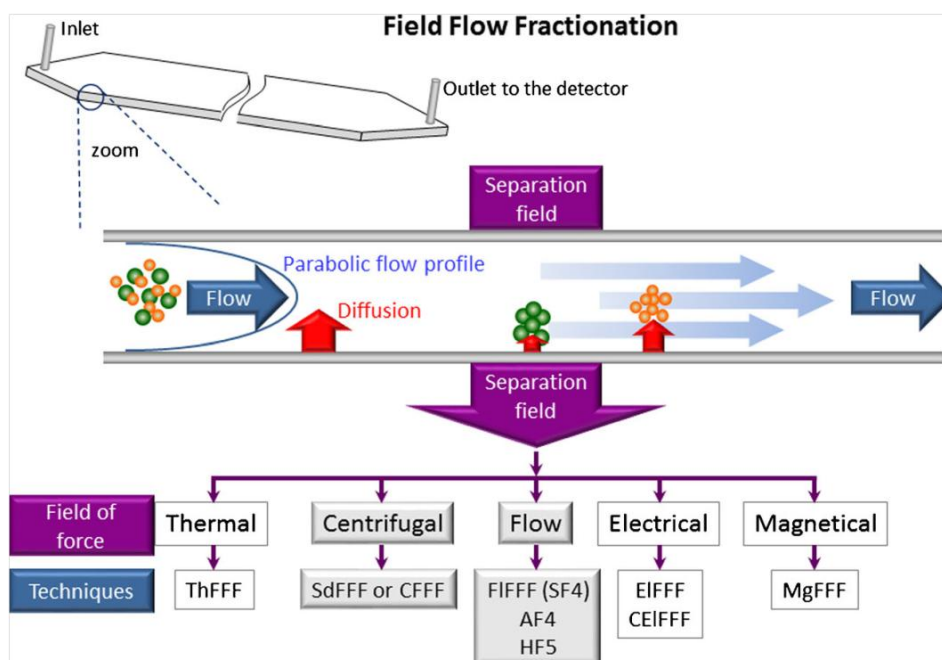


Figura 3 - Esquema simplificado de un canal FFF que funciona en modo normal, donde la difusión contrarresta la acción del campo externo, creando capas de componentes de la muestra, que son transportadas fuera del canal con diferentes velocidades, dependiendo de la lámina de flujo en la que residen (Catia Contado – 2017)¹²

Hay diferentes variantes de FFF, utilizando varios campos de separación, incluyendo térmico, eléctrico, magnético, centrífugo y de flujo cruzado. Este último, es la variante más común y se denomina como AF4⁴ y está en auge como técnica prometedora para el estudio de nanoplasticos, y profundizaremos en ella, en un apartado posterior.

Como otras técnicas de flujo, puede ser acoplado a varios detectores, incluyendo UV-vis, fluorescencia, dispersión de radiación en multiángulo (MALS), dispersión de radiación dinámica (DLS) e ICP-MS. Es una técnica difícil y requiere tiempo y esfuerzo para desarrollar un método⁴.

Técnicas cromatográficas

Las técnicas cromatográficas utilizan una fase estacionaria para la separación de los analitos, que hacen que su aplicabilidad para las partículas en muestras sea difícil, ya que pueden ocurrir interacciones y el tamaño de los poros puede no ser suficiente. Pero su amplia y fácil aplicación, la convierte en una alternativa notable a la FFF, ya que requiere menos optimización y menos experiencia del usuario⁹. Algunas de las más usadas son:

Cromatografía de exclusión de tamaño (SEC) Se basa en el volumen hidrodinámico de partículas, donde las especies más pequeñas se difunden hacia el interior de la estructura de los poros de la fase estacionaria y así eluir más tarde que las de mayor tamaño⁴. Aunque no es muy habitual para la separación de nanopartículas, parece ser una técnica prometedora para la separación e identificación por tamaño de nanoplasticos⁴.

Cromatografía hidrodinámica (HDC) Aplicada a micro y nanoplasticos porque su fase estacionaria es un material no poroso, empaquetado en la columna, en la que la fase móvil fluye a través de los intersticios, Figura 4. Esto, aporta un mayor rango de tamaño (5nm – 1.2µm) y menos interacciones⁹. En su separación combina las ventajas de la dinámica de fluidos y la cromatografía de exclusión⁸.

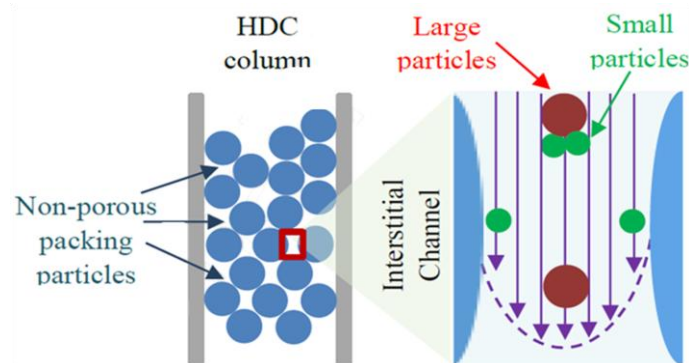


Figura 4 – Mecanismo de HDC para la separación de partículas.
Referencia (Wanyi Fu et al 2020)⁸

Electroforesis capilar (CE)

Es una técnica que emplea la movilidad de las partículas cargadas en un campo eléctrico para lograr una separación espacial⁹. La movilidad electroforética de una partícula es proporcional a su potencial zeta. Puede ser acoplada a diferentes detectores y proporcionar información sobre tamaño y composición química de diferentes polímeros⁴. Este método es capaz de separar nanopartículas plásticas, pero sería necesario adaptarlo a la naturaleza de los nanoplasticos ambientales, especialmente a sus propiedades superficiales, que dependerán de los efectos que las partículas hayan experimentado⁹.

1.2.3 Técnicas de identificación y caracterización

Identificación Visual

A través de microscopios electrónicos, proporcionan la morfología y el tamaño de las partículas, pero no son muy útiles para partículas menores de $1\mu\text{m}$, es decir, las nanopartículas ⁴. Además, la identificación visual por sí sola, conduce a subestimar o sobreestimar la abundancia de microplásticos, no reflejando así la realidad sobre estos contaminantes ⁵.

Estas técnicas ofrecen una alta resolución pero tienen el inconveniente de que las mediciones son largas y laboriosas, que sólo pueden realizarse para partículas o secciones específicas de la muestra, pero no para un análisis representativo. Esto hace que la mayoría de los tipos de microscopía, dependan de un tratamiento y caracterización adecuados de las muestras para garantizar la representatividad ⁹.

Dispersión dinámica de la luz (DLS)

Es una técnica simple para investigar el tamaño hidrodinámico y carga superficial de partículas en ambientes líquidos. Utiliza un rayo láser para pasar a través de la suspensión que contiene las partículas dispersando el láser incidente en diferentes ángulos de dispersión ⁸, aunque habitualmente la medida se realiza a un ángulo concreto, Figura 5.

El movimiento Browniano de las partículas en suspensión induce un cambio en la frecuencia de la luz, que varía con los diferentes tamaños de las partículas. Este cambio en la frecuencia de la luz, da lugar a fluctuaciones de intensidad dependientes del tiempo, que contienen información sobre el tamaño y la forma de las partículas ⁸.

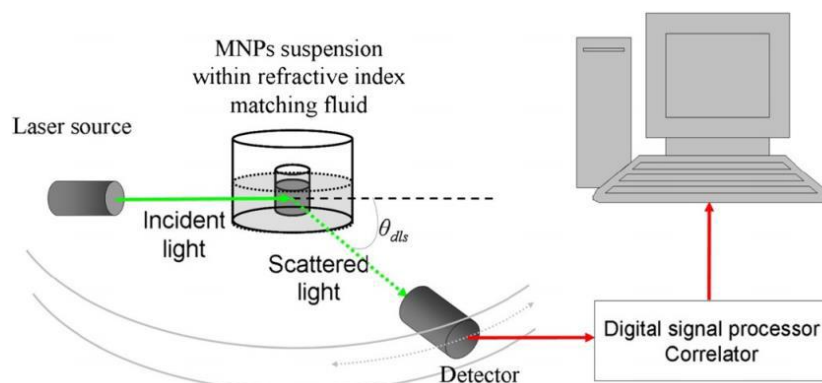


Figura 5 - Representación gráfica del montaje experimental para mediciones en DLS. Referencia (Lim et al 2013) ¹³

Se emplea para la caracterización de micro y nanoplásticos ⁸, pero es muy limitada cuando se dispersan en medios complejos ⁴, que incluyen partículas de mayor tamaño, debido a que dispersan la radiación de manera mucho más intensa que las partículas más pequeñas, solapándose las señales y pudiendo pasar por alto la presencia de partículas pequeñas. Por este motivo, DLS solo puede medir el tamaño promedio ⁸.

Cromatografía de gases acoplada a desorción térmica (TED-GC-MS) o pirolisis (Py-GC-MS)

Son técnicas destructivas que permiten la identificación del tipo de polímero analizando su degradación térmica. Tiene la ventaja de eliminar cualquier paso previo al tratamiento, permitiendo la identificación de múltiples partículas en un solo paso, empleando cantidades mínimas de muestra (5-200mg). Además, permite la identificación simultánea de productos químicos orgánicos asociados a polímeros⁵. Las partículas de plástico pueden identificarse por el patrón de masa característico en MS, mientras que la intensidad de la señal de los iones de los fragmentos indicativos también da información sobre el peso relativo, lo que permite la caracterización cualitativa y cuantitativa de los plásticos simultáneamente¹⁰.

La **cromatografía de gases acoplada a pirolisis (Py-GC-MS)**, se degrada térmicamente en una atmósfera inerte con el resultado de los fragmentos de pirolisis del polímero, que pueden ser separados por cromatografía de gases y caracterizada por espectrometría de masas⁹. Un inconveniente es la necesidad de colocar las muestras manualmente en el tubo de pirolisis⁵. Estudios han demostrado, que esta técnica es adecuada para la determinación de plásticos en aguas residuales, sedimentos de playa y muestras de peces, sin embargo, el límite de detección necesita ser mejorado para la determinación rutinaria de los plásticos¹⁰.

En el caso de la **cromatografía de gases acoplada a desorción térmica (TED-GC-MS)**, no se restringe la degradación térmica de las muestras dentro de un pequeño pirolizador, como ocurre en Py-GC-MS, sino que para la pirolisis se utiliza un analizador termogravimétrico (TGA), por lo que se pueden utilizar muestras con masas más altas¹⁰ (hasta 200 veces más que en Py-GC-MS⁵), resultando atractivo para el análisis de muestras heterogéneas a pequeña escala¹⁰.

Espectroscopia infrarroja – transformada de Fourier (FT – IR)

Comparando con espectros de plásticos conocidos¹⁴, permite la identificación rápida y exacta de los polímeros en base a su espectro IR⁵, dado por la absorción de las transiciones vibratorias, tras irradiar la muestra con luz infrarroja⁹. Además, es capaz de evaluar el envejecimiento de las partículas mediante la observación de la oxidación sobre su superficie. En el modo de transmisión, es capaz de caracterizar micro y nanoplasticos⁴, ya que el límite de tamaño para el análisis está en el rango de 10nm⁹. El único impedimento, es que es incapaz de detectar nanopartículas en concentraciones bajas⁴.

Acoplada a un microscopio IR (Micro-FTIR) recoge señales IR de alta resolución espacial y tiene un gran potencial para la caracterización de muestras complejas desde el punto de vista de la composición⁸.

Espectroscopia Raman

Es una técnica espectroscópica no destructiva que permite observar los modos de baja frecuencia en un sistema, como las interacciones rotacionales y vibratorias. Es una técnica sencilla que proporciona una huella estructural que se ha aplicado ya con éxito en la identificación de plásticos de distintas matrices ambientales ⁵. Además su espectro es complementario al espectro FT-IR ⁹, ya que Raman proporciona una mejor respuesta de los enlaces simétricos no polares, mientras que el FTIR permite una identificación más clara de los grupos polares ¹⁴.

Como la fuente de luz no necesita ser luz infrarroja, pueden utilizarse longitudes de onda más cortas (Ej: 532nm), lo que da lugar a una mayor resolución espacial ⁹. Acoplada a un microscopio (microscopia raman) pueden identificarse partículas de tamaño $1 < \mu\text{m}$. Pero combinándola con la microscopia de fuerza atómica (AFM), permite la identificación de nanoplasticos ⁵, con información espectroscópica en resoluciones espaciales de 10nm ⁹.

También, se está empezando a estudiar la espectroscopia Raman mejorada de superficie (SERS), permitiendo detectar micro y nanoplasticos en disoluciones acuosas de baja concentración, empleando nanopartículas metálicas (Au o Ag) en cuya superficie se adsorbe la muestra, aumentando así la señal obtenida ¹⁵.

Espectroscopia de fluorescencia

Permite la detección de microplásticos en una sola línea de absorción y emisión con alta sensibilidad, pero exige que las muestras sean autofluorescentes, o estén etiquetadas con tintes fluorescentes ⁸.

El uso de tintes orgánicos con propiedades fluorescentes hace que sea una técnica prometedora para el análisis de micro y nanopartículas. Un ejemplo es el Rojo Nilo, tratado en el apartado (1.3).

Al teñir los MP con fuertes emisiones de fluoróforos, es posible identificar su presencia en la superficie. En comparación con la espectroscopia IR, FTIR y Raman, el principal inconveniente de la espectroscopia de fluorescencia es la falta de firmas espectrales inherentes de micropartículas capaces de proporcionar información química sobre el polímero plástico ⁴.

Además, la espectroscopia de fluorescencia ha demostrado ser útil para caracterizar la toxicidad e investigar los efectos negativos de microplásticos para organismos en el suelo o en el agua, como la inhibición de la actividad y trastorno del metabolismo de la energía ⁸.

1.3 Identificación mediante tinción con Rojo Nilo

Como el tema de los nanoplasticos, es reciente y sigue en estudio continuo, van apareciendo nuevas técnicas y estrategias para facilitar su detección. Una de estas nuevas estrategias es emplear otras sustancias, que permitan conseguir cierta selectividad en los ensayos que son o pueden ser sensibles, como es el caso de los colorantes orgánicos.

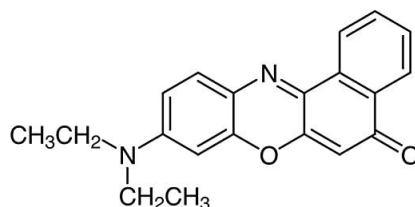


Figura 6 – Estructura molecular del Rojo Nilo

El Rojo Nilo es un colorante fluorescente que se lleva empleando desde hace décadas en ensayos de muestras biológicas, como puede ser en la detección de lípidos intracelulares ¹⁶, aunque en los últimos años, se está empezado a usar para la tinción de polímeros. Es capaz de adsorberse sobre la superficie del plástico y hacerla fluorescente cuando se irradia con luz azul ¹⁷.

Estudios con varios colorantes han revelado que el Rojo Nilo es el mejor para teñir los microplásticos ¹⁸. Ya se ha aplicado a diversos tipos de polímeros como pueden ser: PS, PET, PE, PP, PC, EVA y Nylon-6 [¹⁷, ¹⁹, ²⁰].

Además la naturaleza solvatocrómica del Rojo del Nilo ofrece la posibilidad de una categorización plástica basada en las características de la polaridad de la superficie de las partículas identificadas, pudiendo proporcionar incluso, un indicador útil para evaluar el tiempo de residencia mediante cambios temporales en las propiedades de la superficie, debido a la oxidación o a la bioincrustación en el medio ambiente ¹⁷. El término de bioincrustación hace referencia a la acumulación sucesiva de materia orgánica y organismos, provocando principalmente un cambio, tanto en la superficie como en la densidad, cuyos efectos están en estudio ²¹.

1.4 Técnicas basadas en el fraccionamiento en flujo mediante campo de flujo asimétrico (AF4) para la detección de nanoplasticos

El fraccionamiento en flujo mediante campo de flujo asimétrico (AF4), es la variante más común del FFF ⁴ y es una herramienta poderosa para la separación de NP en todo el rango de tamaño coloidal de 1nm a 1µm, permitiendo, a través del ajuste de parámetros de relajación y elución (sin modificar la composición de la fase móvil y los componentes del canal), una discriminación de alta resolución.

En general es una técnica compleja que requiere una optimización en los parámetros en varios pasos y mucha experiencia del usuario ¹⁰.

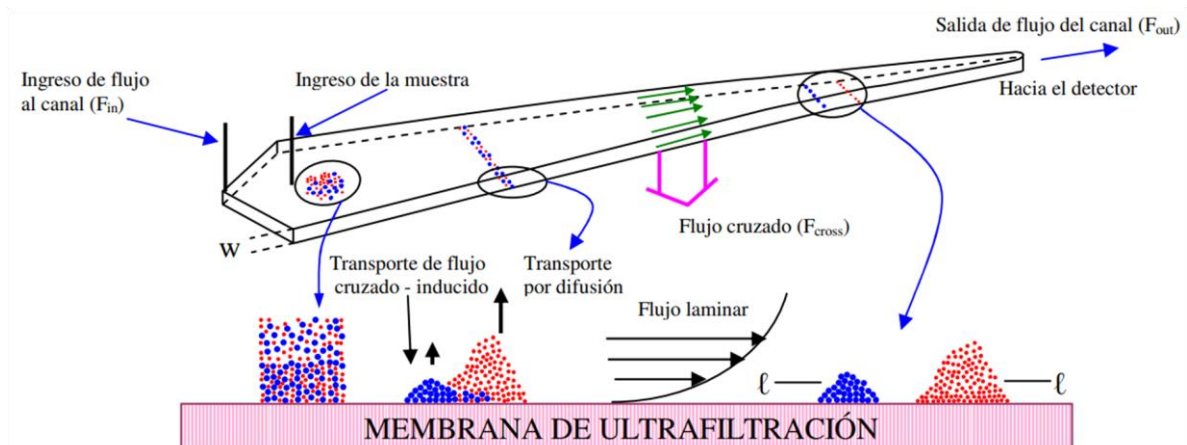


Figura 7 – Principio de separación por AF4, donde se muestra la separación de dos partículas de diferente tamaño. Luego de la inyección y relajamiento de la muestra comienza la elución y las dos poblaciones de partículas comienzan a migrar a diferente velocidad. Las partículas azules representan las de mayor tamaño, mientras que las partículas de color rojo a las pequeñas. W representa el grosor del canal, l la distancia promedio (concentración) de la población de partículas presente en la membrana de ultrafiltración. Referencia (Fuentes et al 2016) ²²

Cuando se utiliza el AF4 para la separación de partículas más grandes (alrededor de 1 μ m), se produce la llamada inversión estérica ⁹. La difusión en partículas de mayor tamaño es muy pequeña, y ya no se oponen al flujo cruzado. Pero aparece otra fuerza opuesta, fundamentalmente de repulsión con la membrana, que justifica que se produzca una elución inversamente proporcional al tamaño, eluyendo así más rápido las partículas de mayor tamaño.

El punto de inversión depende de diferentes parámetros como el grosor del canal, la tasa de flujo o el flujo cruzado ⁹. Este fraccionamiento correspondería al modo estérico, pero para el estudio de nanopartículas, se emplea el modo normal, donde las partículas de tamaño nano y ligeramente más grandes, se separan y como resultado se eluyen las más pequeñas antes que las partículas de mayor tamaño ²³. Por ello es necesario controlar ese punto de inversión.

Como otras técnicas de flujo, se acopla rutinariamente a los detectores en línea, como pueden ser detectores de índice de refracción, de absorción UV-vis o de fluorescencia para la presencia de partículas y DLS, así como la dispersión de luz multiángulo (MALS) para la caracterización del tamaño ⁹. Esta última (AF4-MALS) es reciente, complementa la separación de los polímeros (AF4) con la determinación del tamaño por MALS. Actualmente los porcentajes de recuperación son bajos (50% para NP de 50nm), pero pueden aumentarse, mejorando las condiciones de separación del AF4 ⁵.

Dos inconvenientes del AF4, son la alta dilución de la muestra que se produce durante la migración de la muestra en el canal al detector, lo que limita la sensibilidad de la masa y el otro es que el tamaño de los poros de la membrana impone limitaciones en el rango inferior de masas molares del analito ⁸.

Gigault (2017) demostró la viabilidad de cinco métodos diferentes de AF4 para la determinar rápidamente la presencia de materiales coloidales, identificar diferentes tamaños de plásticos junto con su dispersión, y caracterizar la muestra empleando DLS según la resolución del método de fraccionamiento. Consiguiendo discriminar la presencia de grandes partículas (200-800nm) y de pequeñas (200nm) en un modo de elución normal ³.

Correia (2018) demostró que era posible utilizar AF4 para separar nanoplásticos ingeridos en peces tras realizar una digestión enzimática, detectando su tamaño mediante MALS ²⁴.

Abdolahpur (2019) realizó la separación de nanoplásticos (empleando partículas de PS de 60, 200 y 300nm) utilizando AF4-MALS, obteniendo unas recuperaciones superiores al 80%, y demostrando que la pérdida de partículas debido a la interacción con la membrana era baja. Además simuló el agua natural incluyendo en las suspensiones, materia orgánica natural (NOM). Estudiando así la interacción sobre las nanopartículas observando una pérdida de intensidad y una modificación de su tamaño (distinto tiempo de elución), obteniendo una recuperación menor que en muestras que no contienen NOM ²⁵.

Li (2020) realizó una separación de nanoplásticos en subfracciones con rangos de 10-100nm, 100-200nm, 200-450nm y 450 – 800nm en diámetro ¹⁰.

2. OBJETIVOS

El objetivo fundamental de este trabajo es el estudio de las técnicas analíticas que permiten la detección y caracterización de micro- y nanoplásticos, centrándose en aquellas técnicas de separación basadas en el fraccionamiento en flujo mediante campos, previa tinción con colorantes orgánicos.

Este objetivo implica el desarrollo de objetivos concretos que pueden resumirse en:

- La realización de una búsqueda bibliográfica, cuyos objetivos específicos son el desarrollo de competencias en búsqueda y gestión bibliográfica, sobre la información relacionada con las distintas técnicas y procedimientos que existen a día de hoy para el estudio de micro- y nanoplásticos. Incluyendo las etapas de preconcentración, aislamiento, separación, identificación y caracterización, así como nuevas técnicas o estrategias que pueden ser prometedoras en un futuro cercano.
- El desarrollo de un procedimiento experimental, cuyo objetivo específico es la identificación de micro- y nanoplásticos mediante su tinción con tintes orgánicos con propiedades fluorescentes, como el Rojo Nilo, para su detección mediante fluorescencia molecular y EAM UV-vis. Para este estudio se han empleado partículas de poliestireno en tamaños de micro- y nano, que están siendo utilizadas en números estudios.

El objetivo es demostrar, junto con los resultados y el tratamiento de datos obtenidos, que esta nueva estrategia puede ser útil para el estudio de nanoplásticos, tanto para su detección como para análisis de rutina.

3. PARTE EXPERIMENTAL

3.1 Instrumentación y reactivos

3.1.1 Instrumentación

- Balanza analítica – AND GH-200
- Espectrofotómetro de Fluorescencia – Perkin Elmer LS-45
- Espectrofotómetro UV-vis – Jasco V-730
- Microscopio óptico con objetivos x5, x10, x20 y x100 aumentos (Zeiss) y cámara acoplada Axiocam
- Micropipetas

3.1.2 Aparatos, material y reactivos

- Baño ultrasonidos Selecta
- Centrifuga Thermo Multifuge X1R
- Tubos con filtro para centrifuga. Tamaño de poro 10 kDa.
- Sistema de filtración a vacío
- Filtros de policarbonato 5µm
- Portaobjetos
- Vasos de precipitados
- Viales 10 y 15ml para almacenar las suspensiones
- Pipeta graduada 5ml
- Pipetas pasteur
- Cubetas de cuarzo
- Agua ultrapura (Milli-Q)
- Rojo Nilo
- Metanol, supragradient HPLC grade
- Suspensiones de micro- y nanopartículas de poliestireno (Estándares comerciales)
 - Std poliestireno 30µm – (Duke Standards)
 - Std poliestireno 200nm – (Sigma – Aldrich)

3.2 Procedimientos

Todas las disoluciones preparadas en este trabajo se llevaron a cabo por pesada en la balanza de precisión analítica de los volúmenes cogidos con las micropipetas, para poder conocer la concentración exacta de las disoluciones finales.

Un factor importante a tener en cuenta en las disoluciones que contienen Rojo Nilo, es la necesidad de cuantificarlas en la misma semana en la que se ha producido la tinción, debido a que se produce una pérdida progresiva de la fluorescencia, llegando a una pérdida del 73,5% al cabo de dos meses²⁶.

3.2.1 Tinción de Rojo Nilo sobre micropartículas de poliestireno (PS)

Para observar la correcta tinción sobre las micropartículas de PS se prepararon dos concentraciones distintas de Rojo Nilo (10 y 50µg/ml). Teniendo en cuenta además dos parámetros durante la tinción (agitación por rotación y baño de ultrasonidos).

La disolución de partida de RN (Dis.RN) fue de 1mg/ml (Preparada pesando la cantidad necesaria del reactivo y disolviendo en acetona ¹⁷). La disolución de micropartículas de PS 30µm (Dis.PS30) de $2,8 \times 10^4$ partículas/ml, a partir de la suspensión original, sonicando en baño de ultrasonidos y diluyéndola posteriormente en agua ultrapura hasta el volumen necesario.

Para las disoluciones de 10 y 50 µg/ml, se emplearon volúmenes de 0,030 y 0,150 ml respectivamente, junto con 0,200ml de PS (aprox 1867 part/ml) y empleando agua ultrapura Milli-Q hasta un volumen final de 3ml. Se realiza por duplicado, obteniendo al final 4 disoluciones. Dos de ellas se llevaron al baño de ultrasonidos y las otras dos a agitación por rotación durante 8 minutos.

Posteriormente, se filtró a vacío 1ml de cada suspensión, empleando filtros de policarbonato de 5µm de tamaño de poro. Tras la filtración, se pasó el filtro con unas pinzas a un portaobjetos y se secó durante 10 minutos en la estufa, antes de observar al microscopio.

*Nota: El Rojo Nilo se añade siempre al final, y es necesario mantenerlo, tanto la disolución de partida como las muestras que lo contienen, en condiciones de oscuridad. Para ello se envolvió los viales en papel de aluminio.

3.2.2 Preparación de disoluciones para su medición mediante fluorescencia molecular

Se prepararon 3 disoluciones empleando como disolvente agua ultrapura Milli-Q:

- Disolución de PS: 0,200ml de PS en un volumen final de 3ml.
- Disolución de RN: 0,150ml de RN en un volumen final de 3ml
- Disolución de PS+RN: 0,200ml de PS junto con 0,150ml de RN en un volumen final de 3mL

Posteriormente se prepararon además estas dos últimas disoluciones que contienen RN pero empleando como disolvente metanol:

- Disolución de RN: 0,150ml de RN en un volumen final de 3ml
- Disolución de PS+RN: 0,200ml de PS junto con 0,150ml de RN en un volumen final de 3mL

3.2.3 Preparación de disoluciones para estudiar el efecto Quenching

Se realizaron disoluciones de distinto porcentaje metanol:agua para observar el posible efecto Quenching del disolvente. El aspecto de las disoluciones se encuentra en el Anexo-A 2. Los volúmenes empleados se encuentran en la Tabla 1:

MeOH : Agua →	0 : 100	10 : 90	20 : 80	50 : 50	90 : 10	100 : 10
V MeOH (ml)	0	0,265	0,530	1,325	2,385	2,650
V Agua (ml)	2,650	2,385	2,120	1,325	0,265	0
V (Dis.PS30) (ml)	0,200					
V (Dis.RN) (ml)	0,150					

Tabla 1 – Volúmenes empleados para las distintas disoluciones para estudiar el efecto Quenching

3.2.4 Aislamiento de las partículas teñidas con Rojo Nilo

El aislamiento se realizó a través de la filtración de las suspensiones mediante un sistema de ultrafiltración empleando tubos con un filtro con tamaño de poro de 10kDa, con el objetivo de separar el RN libre en exceso y tener una suspensión de las partículas de PS teñidas.

- a) Primer procedimiento empleado para el aislamiento de las micropartículas de PS teñidas.

El proceso de tinción se realizó de la misma forma que en los apartados anteriores, siendo los volúmenes empleados los que se muestran en la Tabla 2 .

Disoluciones	V (Dis.PS30) (ml)	V (Dis.RN) (ml)	V disolvente (ml)	
			Agua Milli - Q	Metanol
PS en Agua	0,200		2,800	
RN en Agua		0,150	2,850	
PS + RN en Agua	0,200	0,150	2,650	
RN en MeOH		0,150		2,850
PS + RN en MeOH	0,200	0,150		2,650

Tabla 2 – Volúmenes empleados para la preparación de las muestras

A continuación se detalla el procedimiento empleado para el aislamiento.

Se realiza un prelavado del filtro de los tubos para centrifuga con agua durante 12 minutos a 3500 rpm. Seguidamente se añaden las suspensiones, que previamente han estado 8 minutos en el baño de ultrasonidos, a cada uno de los tubos, correctamente etiquetados.

Se centrifuga durante 5 min, siempre a las mismas revoluciones. Después, se elimina el filtrado, y se resuspenden las micropartículas teñidas, adicionando el disolvente correspondiente (Agua o Metanol) hasta la marca de 2ml. Se centrifuga de nuevo 5 min, completando así el primer lavado. De igual forma se realizan un total de 3 lavados.

A continuación, se traspa la suspensión resultante de micropartículas teñidas (aproximadamente se encuentran en 0,100ml) a un vial. Para ello, se adicionan volúmenes pequeños del disolvente correspondiente, sobre el tubo, y se transvasan a un vial hasta llegar a un volumen de 3ml, controlado por pesada en la balanza de precisión analítica.

Con las muestras preparadas, se realizaron los espectros de emisión y absorción, y se compararon a través del microscopio óptico el uso de ambos disolventes. Para ello sobre un portaobjetos se colocaron varias gotas de cada una de las muestras, y se dejaron secar.

b) Procedimiento óptimo para el aislamiento de las micropartículas de PS teñidas

Se realiza la tinción de igual forma que en el apartado anterior con las disoluciones de RN y PS + RN en agua. Además se sigue, el mismo procedimiento de aislamiento de las partículas teñidas, pero realizando un primer lavado con MeOH y el resto con agua, siendo así su resuspensión y transvase a los viales, también en agua. En la Figura 8, se muestra de forma grafica el proceso óptimo de aislamiento, incluyendo los tiempos de centrifuga de prelavados, lavados, así como el disolvente y cantidad en volumen en cada una de las etapas.

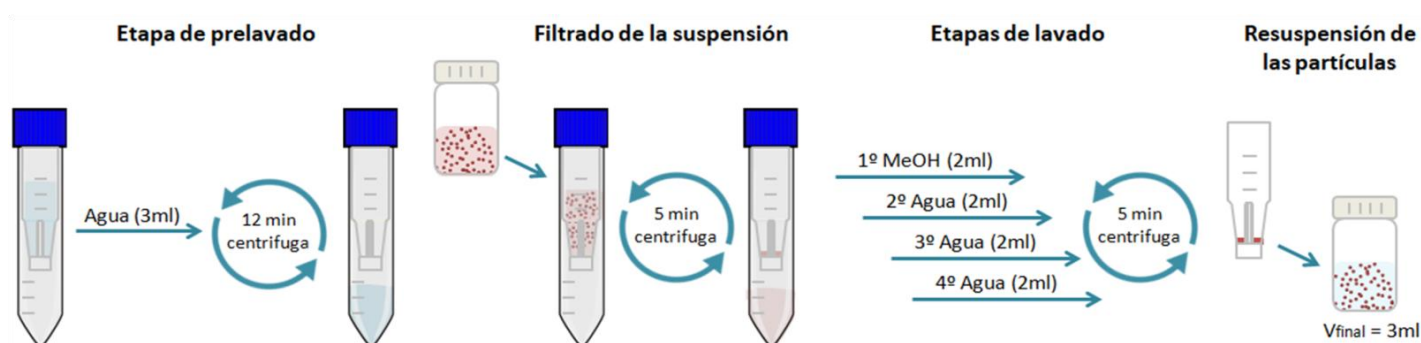


Figura 8 – Representación gráfica esquemática del procedimiento óptimo para el aislamiento de las partículas teñidas.

3.2.5 Preparación de disoluciones para estudiar el efecto tamaño/superficie

Para ello se emplearon tanto las partículas de PS de 30µm junto con otras de tamaño nano, de 200nm. Fue necesario calcular la concentración de partículas de 200nm equivalente en superficie a la empleada hasta ahora con las partículas de 30µm, como se muestra en la Tabla 3.

Considerando que las partículas son totalmente esféricas, se puede calcular la superficie total de una partícula con su radio en la ecuación: Superficie de una esfera = $4 \pi \text{radio}^2$.

	Radio (µm)	Superficie de 1 partícula (cm ²)	Concentración muestra (Part/ml)	Superficie muestra (cm ² /ml)	Concentración equivalente en superficie (Part/ml)
30µm	15	2,83E-05	1,87E+03	5,28E-02	4,20E+07
200nm	0,1	1,26E-09			

Tabla 3 – Datos empleados para el cálculo de la concentración equivalente en superficie de micro y nanopartículas

La concentración de la **disolución inicial de Nanopartículas (Dis.NP.1)** es de $5,5 \times 10^{10}$, conseguida a partir de un estándar de NP de PS 200nm de $5,5 \times 10^{12}$ part/ml.

Para conseguir la concentración equivalente en superficie, fue necesario realizar una disolución intermedia 1:10 (Dis.NP.1:10) de $5,5 \times 10^9$ part/ml, a partir de la Dis.NP.1.

Se prepararon 2 disoluciones:

- PSNPs + RN: que contiene 0,030ml de Dis.NP.1:10 y 0,150ml RN en un volumen final de 3ml.
- RN: Muestra control: 0,150ml RN en un volumen final de 3ml.

Una vez preparadas se realiza el aislamiento de las nanopartículas según el procedimiento óptimo, previamente comentado en el apartado 3.2.4.b, para posteriormente obtener los espectros de absorción, y compararlos así con las micropartículas.

3.2.6 Preparación de disoluciones para estudiar la relación intensidad/concentraciones de partículas

Para ello se prepararon disoluciones con concentraciones de distintos órdenes de magnitud, $5,5 \times 10^6$, $5,5 \times 10^7$, $5,5 \times 10^8$, $5,5 \times 10^9$ y una muestra de control, como se muestra en la Tabla 4 :

	PS exp 6	PS exp 7	PS exp 8	PS exp 9
Dis 1:1 (ml)			0,030	0,300
Dis 1:10 (ml)		0,030		
Dis 1:100 (ml)	0,030			

Tabla 4 – Volúmenes empleados para las muestras de NP de distintos órdenes de magnitud. El volumen de RN es siempre 0,150ml y el enrase con agua hasta un volumen final de 3ml.

Una vez realizada la tinción de las nanopartículas, donde la concentración de RN sigue siendo en exceso respecto a la de las partículas, se realiza el aislamiento según el procedimiento óptimo, comentado en el apartado 3.2.4.b.

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1 Ensayos previos de tinción sobre micropartículas de poliestireno

Las condiciones de partida fueron las utilizadas por Maes ¹⁷. Tras los resultados del microscopio óptico, se observó que las muestras sometidas a un baño ultrasonidos durante la tinción, dieron mejores resultados que por agitación por rotación. Siendo la tinción más homogénea, sobre la superficie de las micropartículas de PS, en la muestra de 50µg/ml de RN.

Teniendo en cuenta que esa diferencia puede ser debida a que las fuerzas intermoleculares implicadas en el proceso son débiles (Van der Waals, dipolo-dipolo), o incluso a una posible interacción con tensoactivos de las partículas, se decidió emplear durante el estudio la concentración de 50µg/ml de Rojo Nilo.

4.2 Optimización del procedimiento de tinción para su medición mediante fluorescencia molecular

Tras realizar los espectros, los rangos y longitudes de emisión y excitación óptimos aparecen en la Tabla 5.

Espectro Excitación	400 – 600 nm	$\lambda_{em}=630$
Espectro Emisión	580 – 700 nm	$\lambda_{exc}=473$

Tabla 5 – Rangos y longitudes de onda empleados en los espectros de excitación y emisión

En la Figura 9, se muestra los espectros de excitación y emisión del Rojo Nilo tanto en agua como en metanol. Se observa que al emplear metanol como disolvente la sensibilidad aumenta significativamente, influyendo la polaridad del disolvente.

En las muestras que contienen como disolvente agua Milli-Q se obtiene una sensibilidad muy baja en las condiciones utilizadas en el estudio. Aumentando la ganancia del equipo, se consigue aumentar ligeramente la sensibilidad pero aumenta el ruido de fondo.

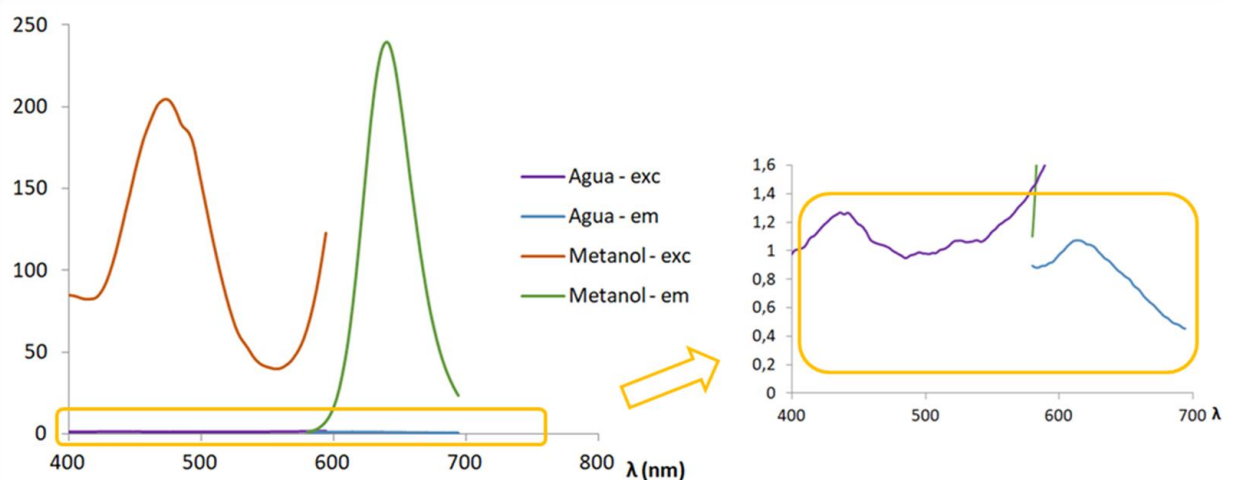


Figura 9 – Espectros de excitación y emisión para el Rojo Nilo empleando como disolventes Agua y Metanol

También se realizó una suspensión con el doble de partículas de PS teñidas en agua y no se observó un aumento significativo de la sensibilidad. Por tanto se siguió trabajando con la concentración habitual.

Además en los espectros de excitación (principalmente en agua) no se observa claramente el máximo, pero en el espectro de emisión se aprecia adecuadamente (Figura 9). Por ello se fijó la longitud de onda de excitación a 473nm, para la realización de los espectros de emisión.

Pero se observó que la muestra en metanol que contenía micropartículas de PS, dio una intensidad ligeramente menor que la muestra que solo llevaba RN y MeOH, Figura 10. Se comprobó que las partículas se encontraban en medio acuoso y era posible que el agua estuviera actuando como quencher, desactivando la fluorescencia.

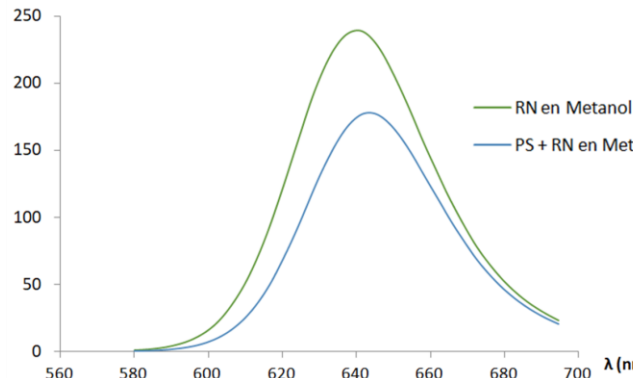


Figura 10 – Espectro de emisión donde se observa una disminución de la intensidad en la muestra con PS

Este último ensayo con una intensidad de 177,9 conteniendo un 6% de agua, equivalente a una concentración de 3,3 M, se demuestra que está en consonancia con la disminución de señal por el efecto Quenching que se estudia a continuación (apartado 4.3). Donde se obtiene para dicha concentración, una intensidad de 169,6. Esta variación puede estar asociada a la incertidumbre o a la interacción con las partículas.

4.3 Efecto Quenching del disolvente sobre la fluorescencia del RN adsorbido sobre micropartículas de PS.

El Quenching está relacionado con una variedad de procesos que incluyen reacciones en estado de excitación, transferencia de energía, dimerización entre los ciclos aromáticos de las moléculas y desactivación por colisión²⁷. A continuación se muestran los espectros de emisión del RN en diferentes proporciones agua:metanol (Figura 11):

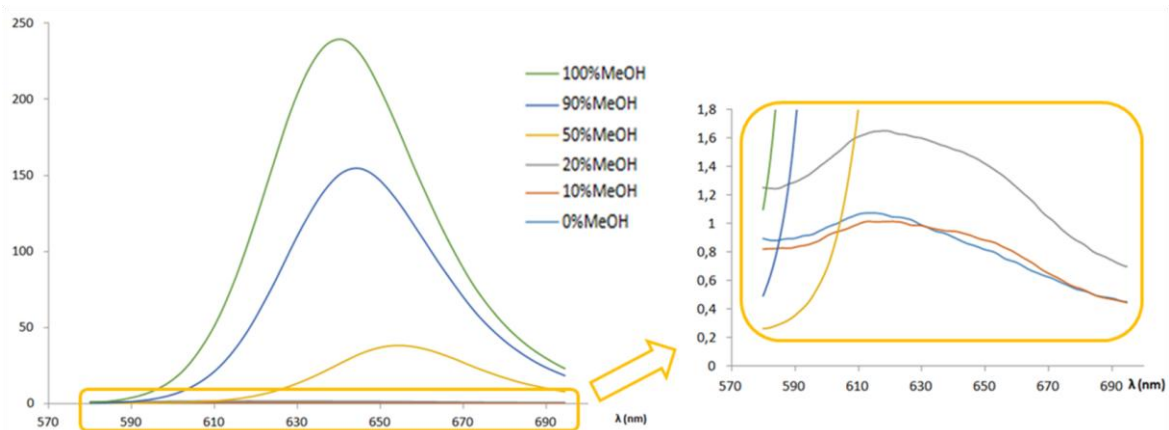


Figura 11 – Espectro de emisión para el estudio del efecto Quenching empleando como disolvente distintas proporciones de Metanol : Agua

Se observa en el espectro una fuerte disminución de la intensidad de la señal conforme aumenta el % de agua. Además de un claro desplazamiento al rojo en las señales de mayor intensidad, no siendo así en las muestras donde la mayor parte es agua. Nos indica que esta desactivación no es debida a solo un parámetro, sino a varios, influyendo tanto en la intensidad como en la longitud de onda del máximo.

Matemáticamente se puede comprobar, aplicando la ecuación de Stern – Volmer (Ec.1), que no se ajusta a una ecuación de orden 1. Siendo el Quencher (Q) en este caso Agua, F_0 la fluorescencia en ausencia de Quencher y K_{SV} la constante de Stern-Volmer

$$\frac{F_0}{F} = 1 + K_{SV} [Q] \quad (\text{Ec.1})$$

Un posible ajuste sería el que se muestra en la Figura 12, donde se pueden observar dos tramos. El segundo de ellos no aparece con ajuste ya que se basa en una intensidad residual de señales muy bajas en fluorescencia, cuando el % de agua es muy alto. Además no pasa por el valor de 1 en la ordenada en el origen, ni sigue una línea recta.

Tiene más sentido el primer tramo, con una ordenada en el origen próxima a 1, cuya ecuación de la recta es: $y = 0,1975x + 0,7601$ con $R^2 = 0,9909$

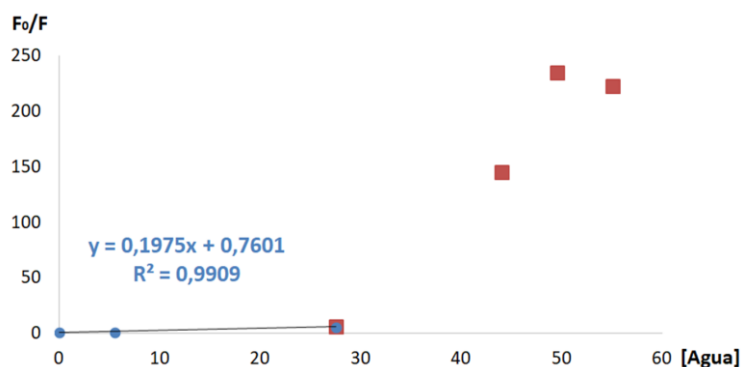


Figura 12 – Representación gráfica de la ecuación de Stern-Volmer, para el estudio del efecto Quenching sobre el disolvente.

Los valores empleados para la representación se encuentran en el Anexo-A 1.

Emplear agua como disolvente podría afectar a las medidas a través de varios factores, observados a partir de los resultados del estudio. Dos de ellos podrían ser los que se comentan a continuación.

El Rojo Nilo debido a la presencia en su estructura de grupos polares, podría interaccionar con las moléculas de agua, formando puentes de hidrogeno, llevando así a su desactivación fluorescente. A su vez, el cambio de polaridad en el medio al combinar metanol y agua, da lugar a un desplazamiento al rojo conforme aumenta la polaridad de la disolución ²⁷, es decir, aumenta la longitud de onda del máximo, conforme aumenta la concentración de agua, apreciándose considerablemente hasta que la proporción es 50:50. Sería necesario realizar un estudio más profundo para conocer con exactitud los factores que conllevan a esta desactivación.

4.4 Estrategias para el aislamiento de las micropartículas

a) Primer procedimiento empleado para el aislamiento de las micropartículas de PS teñidas
En las suspensiones lavadas con agua, se observa (Figura 13), un aumento significativo de la sensibilidad en el espectro de emisión aunque la señal obtenida es muy baja.

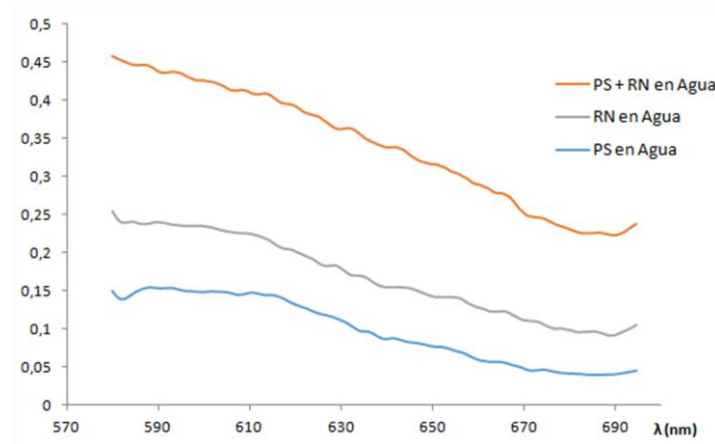


Figura 13 – Espectro de emisión comparando el efecto del RN sobre las micropartículas de PS

Se observa claramente en la Figura 14, un aumento de la señal con las partículas en el medio. Este estudio demuestra que quedan restos de RN en el medio y que no se consiguen aislar del todo las nanopartículas de PS.

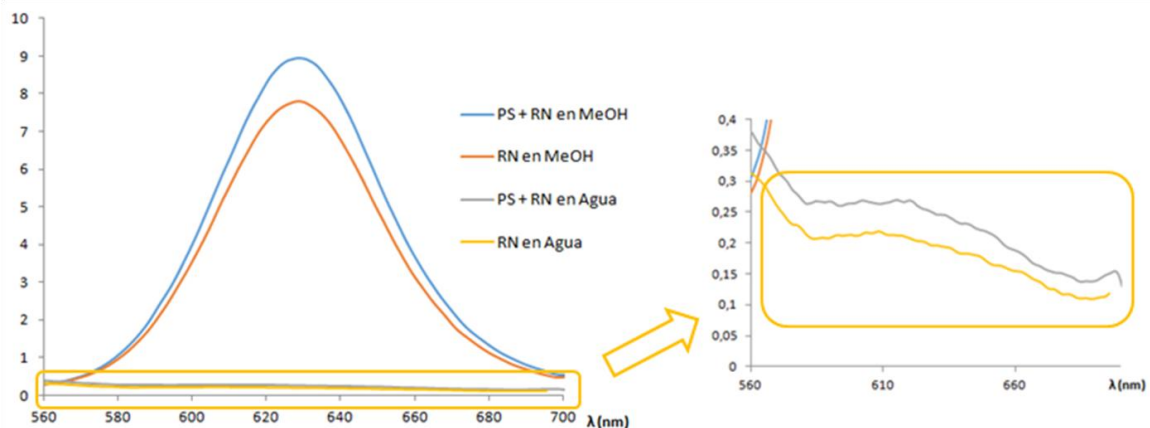


Figura 14 – Espectro de emisión comparando la intensidad según el disolvente empleado

Al realizar los espectros de absorción, Figura 15, se observó que apenas había diferencia entre la señal de agua y la señal de metanol, a pesar que la disolución de MeOH a simple vista era ligeramente rosada (Anexo-B 1). Para metanol se observa claramente el espectro de absorción, mientras que en el caso del agua, no hay máximo y se ve más parecido a un espectro de dispersión, cuyo comportamiento puede estar relacionado con la presencia de partículas (Anexo-B 1).

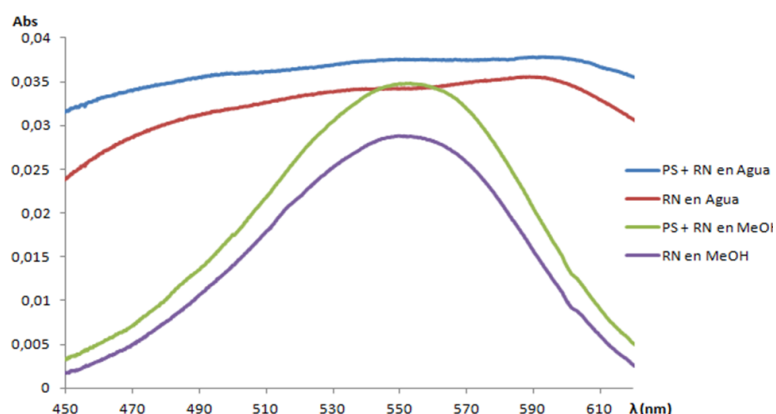


Figura 15 – Espectro de absorción según el disolvente

Tras observar el resultado de las imágenes en el microscopio óptico (Figura 16), se llegó a la conclusión que el MeOH disuelve las micropartículas de PS (solo se logró encontrar una partícula teñida), por tanto la señal que da en los diferentes espectros, está relacionada con la disolución del RN en MeOH.

Empleando agua, siguen quedando restos de RN, debido a que la solubilidad en agua es muy pequeña (0,2mg/ml). Puede observarse también a simple vista en la figura del Anexo-B 1.

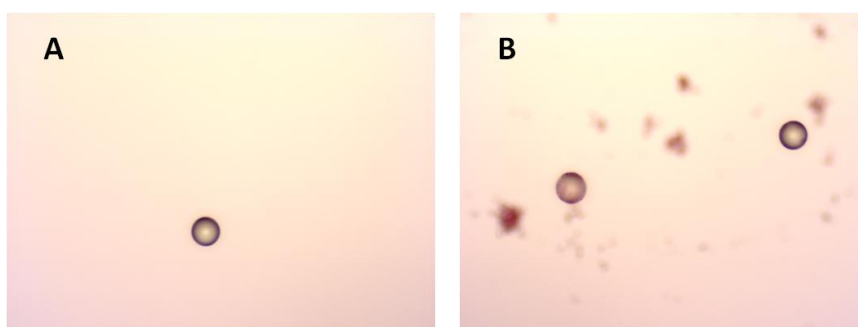


Figura 16 – Imágenes microscopio óptico – Comparación de disolvente - Única partícula encontrada en MeOH (A). En agua (B) se observan junto con restos de RN

Por tanto, se decidió eliminar el MeOH como disolvente en la preparación de las muestras, pero sí que se estudió, en el apartado siguiente, emplear un primer lavado en metanol para eliminar desde el inicio, gran parte del exceso de RN que queda en la disolución, así como restos en el filtro.

A partir de aquí, se empezó a trabajar únicamente con EAM-UV-vis, debido a que el único disolvente con el que se trabajó fue con agua ultrapura, que generaba efectos Quenching en las medidas de fluorescencia molecular.

b) Procedimiento óptimo para el aislamiento de las micropartículas de PS

Realizando un primer lavado con MeOH y el resto con agua, se obtuvieron mejores resultados.

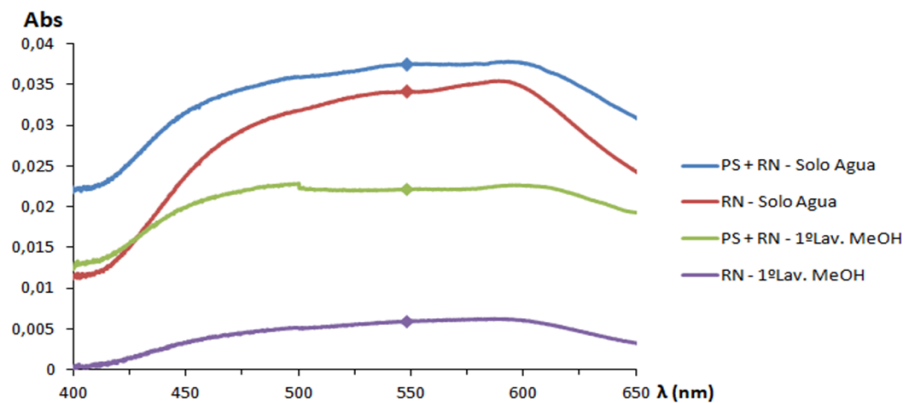


Figura 17 – Espectro de absorción destacando los puntos con $\lambda=548\text{nm}$

En la Figura 17 se observa que la señal es ligeramente superior empleando solamente lavados con agua, pero la diferencia entre la suspensión (contiene PS+RN), y la de control (solo RN), entre los puntos destacados, es muy pequeña, lo que nos indica que utilizando solo agua no logramos aislar las micropartículas teñidas de los restos de RN que se mantienen tanto en la disolución como en el filtro.

	Absorbancia a 548nm	Diferencia
PS + RN – Solo Agua	0,03747	0,00332
RN – Solo Agua	0,03415	
PS + RN – 1º Lav. MeOH	0,02217	0,01623
RN – 1º Lav. MeOH	0,00594	

Tabla 6 – Absorbancias obtenidas en el espectro de absorción a una longitud de onda de 548nm

Realizando un primer lavado con MeOH, se consigue una mejor sensibilidad. Siendo la diferencia entre la muestra con PS y la de control, casi un 500% más, que empleando solo agua como se observa en la Tabla 6. Por tanto, al obtener estos mejores resultados, se decidió emplear este procedimiento de aislamiento, para futuras muestras tanto de micro como de nanopartículas.

4.5 Efecto del tamaño/superficie de las partículas de PS sobre su detección

A continuación se muestra el espectro (Figura 18), de las micro- y nanopartículas de PS previamente teñidas con RN y su posterior aislamiento, con el objetivo de comprobar que empleando una superficie total similar en tamaño micro- y nano, se obtiene una intensidad similar. Al lado aparece la Tabla 7 que incluye los valores de superficie total y absorción a 548nm. Los valores empleados para los cálculos se encuentran detallados en el Anexo-C 1.

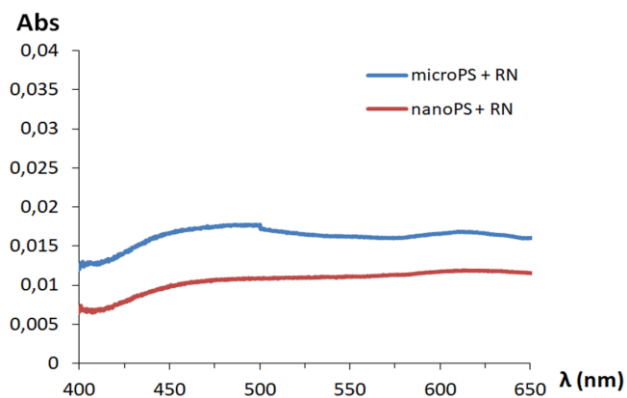


Figura 18 – Espectro de absorción comparando las partículas de tamaño micro- y nano, con una superficie total similar.

	Superficie total (cm ² /ml)	Abs en 548nm
30 μm	5,20E-02	0,0162
200 nm	6,20E-02	0,0111

Tabla 7 – Valores de superficie total y absorción, para las micro- y nanopartículas.

Se observa que las micropartículas con una superficie total menor que las de tamaño nano, dan una mayor absorción, cuando teóricamente debería ser la relación entre la absorción y la superficie directamente proporcional. Este comportamiento puede estar relacionado con la incertidumbre de las medidas, o una diferente interacción de unas partículas y otras. Serían necesarias más medidas para confirmar estos resultados.

4.6 Estudio de la relación intensidad/concentración de partículas

En la Figura 19 se muestra el espectro de absorción obtenido para los distintos grados de concentración de nanopartículas de PS.

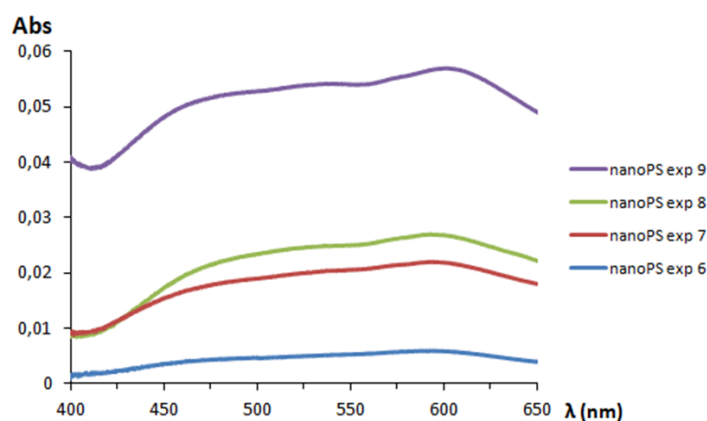


Figura 19 – Espectro de absorción del estudio de la relación intensidad/concentración de Nanopartículas

Para realizar el estudio se representó gráficamente la relación entre la intensidad obtenida a $\lambda=548$ y las concentraciones de las disoluciones de nanopartículas de distintos órdenes de magnitud. Los datos reales para el cálculo de estas concentraciones se encuentran en el Anexo-D 1.

En la figura Figura 20 se observa que no sigue un ajuste del todo lineal. Tras eliminar el punto correspondiente a la disolución de NanoPS exp8, considerado como anómalo y realizar un ajuste logarítmico, Figura 21, la intensidad se ajusta con la concentración de partículas, siguiendo la siguiente ecuación: $y=0,0069\ln x - 0,1012$ con un $R^2=0,9984$.

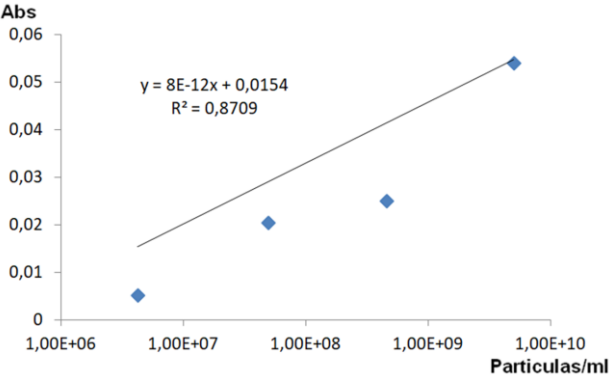


Figura 20 - Representación con ajuste lineal de la relación entre la intensidad y el número de partículas

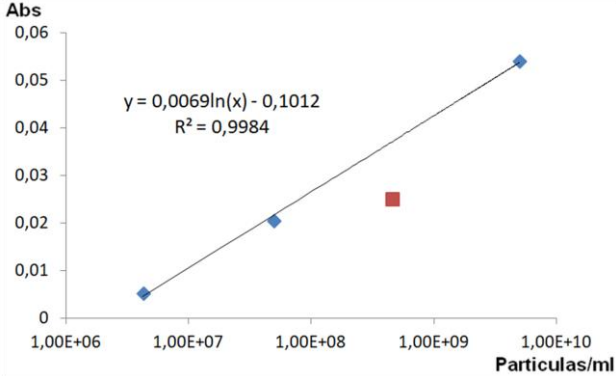


Figura 21 – Representación con ajuste logarítmico de la relación entre la intensidad y el número de partículas, eliminando el punto que corresponde a NanoPS exp8

5 CONCLUSIONES

Las conclusiones de este trabajo de Fin de Grado pueden resumirse en los siguientes puntos:

- A día de hoy no existe un procedimiento experimental ni una técnica adecuada para detectar micro- y nanoplásticos en muestras de interés ambiental, siendo la principal limitación el rango de tamaños que pueden separar.
- Debido a que las muestras reales son complejas, la mayor parte de los estudios emplean partículas de plástico sintéticas como punto de partida. Actualmente se están empleando distintas técnicas, intentando mejorar sus ventajas y minimizar sus inconvenientes.
- El procedimiento actual para el estudio de microplásticos consiste principalmente en la separación por filtración/centrifugación/densidad y el posterior conteo por técnicas de microscopia, bien óptica, bien microraman para su caracterización.
- La limitación de estas técnicas para los nanoplásticos, hace que sean más atractivas otras basadas en sistemas de flujo como FFF, SEC y HDC, ya que la separación de las partículas se puede llevar a cabo de forma rápida y se pueden acoplar fácilmente a varios detectores para su cuantificación y caracterización, proporcionando información en tiempo real sobre el tipo de polímeros, cantidad y tamaño de las partículas.
- Destacar el AF4, como técnica en auge y muy prometedora para el estudio de nanoplásticos en análisis de rutina. Permitiendo la separación en todo el rango de tamaño coloidal de 1nm a 1 μ m, pudiendo generar subfracciones de distintos intervalos de tamaño dependiendo de las condiciones empleadas. Capaz de acoplarse a distintos detectores, pero con la limitación de que no suelen ser muy selectivos a la naturaleza de la partícula. Por este motivo, aparecen estrategias nuevas como la tinción.
- El uso de tintes orgánicos, como el Rojo Nilo, permiten obtener una mayor selectividad en los ensayos para su posterior detección por EAM UV-vis. A su vez, su combinación con AF4, evita realizar un aislamiento previo de las partículas teñidas, debido a que la ultrafiltración elimina la gran parte del exceso de RN del medio, así como la aparición de una señal independiente en el espectro, de los posibles restos que pudieran quedar.

BIBLIOGRAFÍA

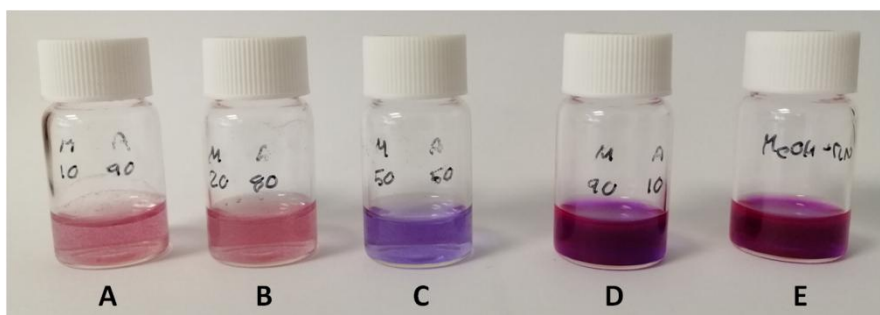
- [1] Lambert, S., & Wagner, M. (2016). Characterisation of nanoplastics during the degradation of polystyrene. *Chemosphere*, 145, 265-268. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2015.11.078>
- [2] Hale, R. C. (2017). Analytical challenges associated with the determination of microplastics in the environment. *Analytical Methods*, 9(9), 1326-1327. <https://doi.org/10.1039/c7ay90015e>
- [3] Gigault, J., El Hadri, H., Reynaud, S., Deniau, E., & Grassl, B. (2017). Asymmetrical flow field flow fractionation methods to characterize submicron particles: application to carbon-based aggregates and nanoplastics. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 409(29), 6761-6769. <https://doi.org/10.1007/s00216-017-0629-7>
- [4] Barbosa Jr., F., Adeyemi, J.A., Bocato, M.Z., Comas, A., Campiglia, A., A critical viewpoint on current issues, limitations, and future research needs on micro- and nanoplastic studies: From the detection to the toxicological assessment., *Environmental Research* (2020), doi: <https://doi.org/10.1016/j.envres.2019.109089>
- [5] Pinto da Costa, J., Reis, V., Paço, A., Costa, M., Duarte, A. C., & Rocha-Santos, T. (2019). Micro(nano)plastics – Analytical challenges towards risk evaluation. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 111, 173-184. <https://doi.org/10.1016/j.trac.2018.12.013>
- [6] Gigault, J., Halle, A. ter, Baudrimont, M., Pascal, P.-Y., Gauffre, F., Phi, T.-L., ... Reynaud, S. (2018). Current opinion: What is a nanoplastic? *Environmental Pollution*, 235, 1030-1034. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2018.01.024>
- [7] S. Gangadoo, S. Owen, P. Rajapaksha, et al., Nano-plastics and their analytical characterisation and fate in the marine environment: From source to sea, *Science of the Total Environment* (2020), <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.138792>
- [8] W. Fu, J. Min, W. Jiang, et al., Separation, characterization and identification of microplastics and nanoplastics in the environment, *Science of the Total Environment* (2020), <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.137561>
- [9] Schwaferts, C., Niessner, R., Elsner, M., & Ivleva, N. P. (2019). Methods for the analysis of submicrometer- and nanoplastic particles in the environment. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 112, 52-65. <https://doi.org/10.1016/j.trac.2018.12.014>
- [10] Li, P., Li, Q., Hao, Z., Yu, S., & Liu, J. (2020). Analytical methods and environmental processes of nanoplastics. *Journal of Environmental Sciences*, 94, 88-99. <https://doi.org/10.1016/j.jes.2020.03.057>
- [11] Hernandez, L. M., Yousefi, N., & Tufenkji, N. (2017). Are There Nanoplastics in Your Personal Care Products? *Environmental Science & Technology Letters*, 4(7), 280-285. <https://doi.org/10.1021/acs.estlett.7b00187>
- [12] Contado, Catia. (2017). Field flow fractionation techniques to explore the “nano-world”. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 409(10), 2501-2518. <https://doi.org/10.1007/s00216-017-0180-6>
- [13] Lim, J., Yeap, S. P., Che, H. X., & Low, S. C. (2013). Characterization of magnetic nanoparticle by dynamic light scattering. *Nanoscale Research Letters*, 8(1), 381. <https://doi.org/10.1186/1556-276x-8-381>
- [14] Silva, A. B., Bastos, A. S., Justino, C. I. L., da Costa, J. P., Duarte, A. C., & Rocha-Santos, T. A. P. (2018). Microplastics in the environment: Challenges in analytical chemistry - A review. *Analytica Chimica Acta*, 1017, 1-19. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2018.02.043>

- [15] Lv, L., He, L., Jiang, S., Chen, J., Zhou, C., Qu, J., ... Li, C. (2020). In situ surface-enhanced Raman spectroscopy for detecting microplastics and nanoplastics in aquatic environments. *Science of The Total Environment*, 728, 138449. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.138449>
- [16] Greenspan, P., Mayer, E. P., & Fowler, S. D. (1985). Nile red: a selective fluorescent stain for intracellular lipid droplets. *The Journal of Cell Biology*, 100(3), 965-973. <https://doi.org/10.1083/jcb.100.3.965>
- [17] Maes, T., Jessop, R., Wellner, N., Haupt, K., & Mayes, A. G. (2017). A rapid-screening approach to detect and quantify microplastics based on fluorescent tagging with Nile Red. *Scientific Reports*, 7, <https://doi.org/10.1038/srep44501>
- [18] Prata, J. C., Reis, V., Matos, J. T. V., da Costa, J. P., Duarte, A. C., & Rocha-Santos, T. (2019). A new approach for routine quantification of microplastics using Nile Red and automated software (MP-VAT). *Science of The Total Environment*, 690, 1277-1283. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2019.07.060>
- [19] Shim, W.J., et al., Identification and quantification of microplastics using Nile Red staining, *Marine Pollution Bulletin* (2016), <http://dx.doi.org/10.1016/j.marpolbul.2016.10.049>
- [20] Erni-Cassola, G., Gibson, M. I., Thompson, R. C., & Christie-Oleza, J. A. (2017). Lost, but Found with Nile Red: A Novel Method for Detecting and Quantifying Small Microplastics (1 mm to 20 μ m) in Environmental Samples. *Environmental Science & Technology*, 51(23), 13641-13648. <https://doi.org/10.1021/acs.est.7b04512>
- [21] Kaiser, D., Kowalski, N., & Waniek, J. J. (2017). Effects of biofouling on the sinking behavior of microplastics. *Environmental Research Letters*, 12(12), 124003. <https://doi.org/10.1088/1748-9326/aa8e8b>
- [22] Fuentes, C., Osorio, D., Peñarrieta, M., & Nilsson, L. (2016) Separation and characterization of macromolecules by AF4. *Revista Boliviana de Química*, 33(2), 72-80.
- [23] Baalousha, M., Stolpe, B., & Lead, J. R. (2011). Flow field-flow fractionation for the analysis and characterization of natural colloids and manufactured nanoparticles in environmental systems: A critical review. *Journal of Chromatography A*, 1218(27), 4078-4103. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2011.04.063>
- [24] Correia, M., & Loeschner, K. (2018). Detection of nanoplastics in food by asymmetric flow field-flow fractionation coupled to multi-angle light scattering: possibilities, challenges and analytical limitations. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 410(22), 5603-5615. <https://doi.org/10.1007/s00216-018-0919-8>
- [25] Abdolahpur Monikh, F., Grundschober, N., Romeijn, S., Arenas-Lago, D., Vijver, M.G., Jiskoot, W., Peijnenburg, W.J.G.M., Development of methods for extraction and analytical characterization of carbon-based nanomaterials (nanoplastics and carbon nanotubes) in biological and environmental matrices by asymmetrical flow field-flow fractionation, *Environmental Pollution* (2019), doi: <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2019.113304>
- [26] J.C. Prata, J.R. Alves, J.P. da Costa, et al., Major factors influencing the quantification of Nile Red stained microplastics and improved automatic quantification (MP-VAT 2.0), *Science of the Total Environment* (2020), <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.137498>
- [27] Rumin, J., Bonnefond, H., Saint-Jean, B., Rouxel, C., Sciandra, A., Bernard, O., ... Bougaran, G. (2015). The use of fluorescent Nile red and BODIPY for lipid measurement in microalgae. *Biotechnology for Biofuels*, 8(1), 42. <https://doi.org/10.1186/s13068-015-0220-4>

A) Estudio del efecto Quenching

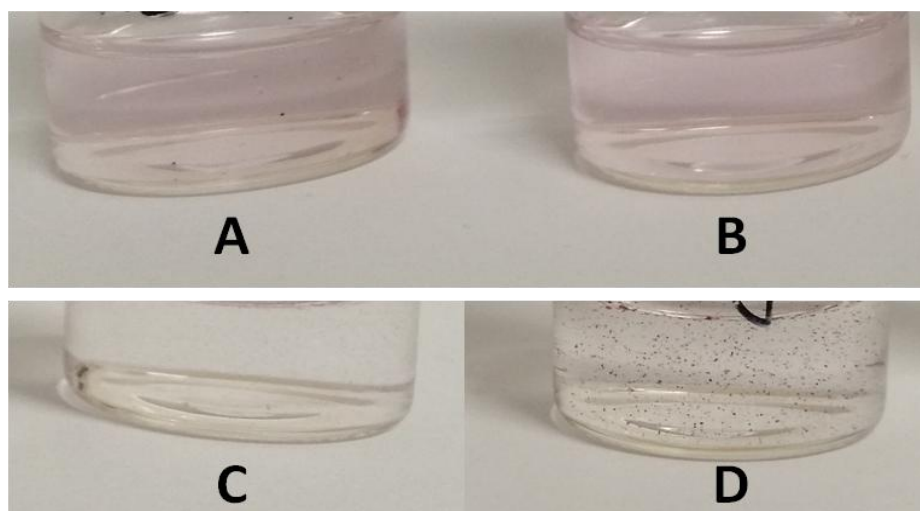
MeOH (%)	Agua (%)	[Agua]	Imax Señal	F0/F
100	0	0,0	239,52	1,00
90	10	5,5	154,85	1,55
50	50	27,5	38,31	6,25
20	80	44,0	1,65	145,23
10	90	49,5	1,02	235,25
0	100	55,0	1,07	223,13

Anexo-A 1 – Datos empleados en el estudio del Efecto Quenching para la representación grafica de Stern-Volmer



Anexo-A 2 - Aspecto de las disoluciones de RN con distinta concentración MeOH:Agua, ordenadas según el %MeOH. 10%(A), 20%(B), 50%(C), 90%(D) y 100%(E)

B) Aislamiento de las partículas



Anexo-B 1 - Imágenes de los viales. RN en MeOH (A), PS+RN en MeOH (B), RN en Agua (C) y PS+RN en Agua (D)

C) Estudio efecto tamaño/superficie de las partículas de PS

	Concentración inicial (part/ml)	Volumen por pesada pipeteado (g)	Volumen por pesada final (g)	Concentración final (part/ml)	Superficie 1 partícula (cm ²)	Superficie total (cm ² /ml)	Abs en 548nm
30µm	2,80E+04	0,2006	3,057	1,84E+03	2,83E-05	5,20E-02	0,01622
200nm	5,15E+09	0,0291	3,035	4,93E+07	1,26E-09	6,20E-02	0,01106

Anexo-C 1 - Datos empleados para el cálculo de la superficie total, para las suspensiones de micro-y nano.

D) Estudio de la relación intensidad/concentración de partículas de PS

Concentración de partida (part/ml)		Volumen por pesada pipeteado (g)	Volumen por pesada final (g)	Concentración final obtenida (part/ml)	
Estándar NP	5,5E+12	0,0483	5,038	Dis.NP. 1	5,27E+10
Dis. NP. 1	5,27E+10	0,0963	0,9866	Dis.NP. 1:10	5,15E+09
Dis. NP. 1	5,27E+10	0,0459	5,0062	Dis.NP. 1:100	4,83E+08

Anexo-D 1 -Volúmenes reales obtenidos por pesada, para preparar todas las concentraciones de nanopartículas de PS, a partir del estándar.

Volumenes (ml)	PS exp 6	PS exp 7	PS exp 8	PS exp 9	RN - Control
Dis.NP 1:1			0,0288	0,2958	
Dis.NP 1:10		0,0291			
Dis.NP 1:100	0,0278				
Agua	2,8423	2,8478	2,8326	2,8320	2,8404
V Adición RN	0,150	0,150	0,150	0,150	0,150
Volumen TOTAL	3,0201	3,0269	3,0114	3,2778	2,9904

	PS exp 6	PS exp 7	PS exp 8	PS exp 9	RN - Control
Volumen final (ml)	3,1838	3,035	3,327	3,1349	3,2555
Conc. Final (Part/ml)	4,221E+06	4,935E+07	4,564E+08	4,975E+09	

Anexo-D 2 - Volúmenes reales para preparar las distintas suspensiones de NP de distintos grados de concentración, así como el volumen y concentración final, tras pasar a los viales, después de los lavados con centrifugación.

	(Part/mL)	Superficie (cm ² /mL)	Masa (g/mL)
PS exp 6	4,221E+06	5,305E-03	1,857E-08
PS exp 7	4,935E+07	6,201E-02	2,170E-07
PS exp 8	4,564E+08	5,736E-01	2,008E-06
PS exp 9	4,975E+09	6,252E+00	2,188E-05

Anexo-D 3 - Datos en superficie y masa, para las suspensiones de distintos grados de concentración de NP