



**Universidad
Zaragoza**



Evaluación de posibles estrategias basadas en la tinción fluorescente combinada con técnicas de separación para la detección de nanoplásticos

Trabajo Fin de Grado

Antonio Arbués Pérez

Director: Eduardo Bolea Morales

Departamento de Química Analítica, Universidad de Zaragoza

Grupo de Espectroscopia Analítica y Sensores (GEAS)



Febrero 2022

Resumen/Abstract

La necesidad y facilidad de uso de los plásticos para diversos propósitos en la actualidad, ha llevado a la sociedad a darse cuenta de que el uso incorrecto de estos materiales puede conducir a efectos indeseados en el medio ambiente.

Los plásticos, con el tiempo, se degradan y reducen su tamaño de partícula hasta escala micro o incluso nano. Éstos se introducen en el agua y suelos, alterando los ecosistemas y cadenas alimentarias.

Queda clara la necesidad de investigación de nuevas formas de análisis de plásticos, capaces de ofrecer una buena sensibilidad incluso en tamaños nano y a concentraciones bajas. La mayor parte de las técnicas que se emplean actualmente presentan limitaciones en ambos aspectos, por lo que es necesario explorar metodologías alternativas basadas en técnicas que permitan trabajar en el rango de tamaños y concentraciones esperados.

En el presente trabajo se plantea la posibilidad de utilizar reactivos fluorescentes que han demostrado su afinidad con distintos materiales plásticos para su identificación previa separación mediante diferentes técnicas de separación como la ultrafiltración y el fraccionamiento en flujo mediante campo de flujo asimétrico (AF4). Se han evaluado diferentes estrategias utilizando rojo Nilo y Rodamina B como reactivos de tinción, así como su detección mediante fluorescencia molecular y absorción molecular UV-Vis. Se han utilizado distintas suspensiones de poliestireno y polipropileno de tamaños inferiores a 1 μm como modelos de nanoplásticos. Finalmente se describe la identificación de un nanoplástico adicionado a un agua de río mediante AF4-EAM-UV-Vis.

The need and ease of the use of plastics nowadays for a wide range of purposes, has led society to notice that the incorrect handling of these materials can drive to unwanted effects in the environment.

Plastics can break down over time and reduce their particle size down to micro and even nano scales. These can introduce themselves in water and soils, disrupting ecosystems and food chains.

It is clear the need for further investigation of new forms of analysis for plastics, capable of offering good sensitivities even in nano sizes and at low concentrations. Most of the techniques used nowadays show limitations in both aspects, and because of that it is necessary to explore new alternative methodologies based on techniques that work in the expected size and concentration ranges.

This work proposes the possibility of using fluorescent reactivos that have shown affinity with diverse plastic materials for their identification after being separated with several techniques as the ultrafiltration and the asymmetric flow field flow fractionation (AF4). Some strategies have been evaluated using Nile Red and Rhodamine B as dyeing/marker reactivos, as well as their

detection with molecular fluorescence and molecular absorption UV-Vis. Polystyrene and polypropylene suspensions with sizes smaller than 1 μm were used as references of nanoplastics. Finally, the identification of a nanoplastic added to a river water sample was described using AF4-EAM-UV-Vis.

ÍNDICE

1. Introducción
 - 1.1. Antecedentes
 - 1.2. Detección y caracterización de los microplásticos. Técnicas de separación, preconcentración y caracterización comúnmente empleadas.
 - 1.2.1. Técnicas de separación. Aislamiento de los microplásticos.
 - 1.2.2. Digestiones. Eliminación de materia orgánica.
 - 1.2.3. Técnicas de preconcentración.
 - 1.2.3.1. Filtración con membrana
 - 1.2.3.2. Ultrafiltración
 - 1.2.3.3. Evaporación de solvente
 - 1.2.4. Técnicas de caracterización.
 - 1.2.4.1. Técnicas de microscopía
 - 1.2.4.2. Técnicas espectroscópicas
 - 1.2.4.3. Técnicas termométricas y cromatográficas
 - 1.3. Estrategias basadas en el uso de tintes fluorescentes para la identificación de microplásticos mediante microscopía de fluorescencia.
 - 1.4. Alternativas para la detección de microplásticos de menor tamaño y nanoplásticos.
 - 1.5. Técnicas de ultrafiltración. Técnicas de fraccionamiento en flujo mediante campo de flujo asimétrico (AF4). Fundamentos y aplicaciones al análisis de nanopartículas.
2. Objetivos
3. Parte experimental
 - 3.1. Instrumentación y reactivos
 - 3.1.1. Instrumentación
 - 3.1.2. Aparatos y material
 - 3.1.3. Reactivos
 - 3.1.4. Muestras
 - 3.2. Procedimientos iniciales y de preparación
 - 3.2.1. Preparación de suspensiones diluidas de partículas de poliestireno (PS) a partir de la suspensión patrón
 - 3.2.2. Preparación de una disolución inicial 1g/l de Rojo Nilo
 - 3.2.3. Preparación de una disolución inicial de 1g/l de Rodamina B
 - 3.2.4. Preparación de una suspensión de polipropileno (PP)
 - 3.2.5. Preparación de una suspensión de PP para ensayo
 - 3.3. Procedimiento de tinción de los nanoplásticos con Rojo Nilo y con Rodamina B
 - 3.3.1. Procedimiento para el aislamiento de la fracción nanoparticulada de plásticos tras la tinción mediante ultrafiltración
 - 3.4. Medidas en Espectrofotometría de Absorción Molecular UV-Vis
 - 3.5. Medidas en Fluorescencia Molecular
 - 3.6. Procedimiento de preparación del sistema de AF4
 - 3.7. Medidas en sistema de AF4
4. Resultados y discusión
 - 4.1. Caracterización de las propiedades ópticas de suspensiones de microplásticos objeto de estudio y de los compuestos de tinción Rojo Nilo y Rodamina B

- 4.2. Estrategias para el aislamiento de microplásticos teñidos. Ensayos de ultrafiltración (UF)
 - 4.2.1. Ensayos con PS
 - 4.2.2. Ensayos con PP
- 4.3. Estrategias de separación de microplásticos teñidos. Ensayos con AF4.
 - 4.3.1. Caracterización de los compuestos sujetos a estudio en fractogramas de un AF4 y acoplamiento a fluorescencia
 - 4.3.2. Ensayos sobre una muestra de agua de río
- 5. Conclusiones
- 6. Bibliografía
- 7. Anexos

1.- Introducción

1.1. Antecedentes

Los plásticos han sido uno de los materiales estrella desde principios del siglo XIX, momento en el que entraron en una época de desarrollo muy rápida, dando el paso de polímeros naturales, que normalmente estaban basados en caucho o resinas (por ejemplo, látex) y que se procesaban mediante vulcanización (en 1839, Goodyear en América y Hancock en Inglaterra), hacia polímeros sintéticos.

El uso de plásticos ha sido crucial en el último siglo, y todavía a día de hoy, es uno de los materiales más usados. La clave reside en la facilidad de elaboración y procesamiento, la capacidad de ofrecer un amplísimo abanico de usos y propiedades, y a nivel económico, su bajo coste, haciéndolo viable en situaciones donde otros materiales no resultan competitivos.

Aunque si bien es cierto que su uso ha proporcionado muchos beneficios, ciertos aspectos requieren nuestra atención. El incorrecto tratamiento tras la utilización de los plásticos provoca la acumulación de los mismos en la naturaleza. De acuerdo con la UNEP (*United Nations Environment Program*), más del 80% de la basura marina sería plástico^[1], por lo que no es de extrañar que se considere ya como un riesgo de polución ambiental.

Este riesgo no sólo reside en la acumulación directa de los residuos, sino que se deben tener en cuenta otros efectos que pueden alterar estos materiales una vez desechados, provocados por esfuerzos físicos (por ejemplo, abrasión), e incluyendo la exposición a radiación UV. Estos efectos pueden provocar la aparición de los llamados microplásticos^[2].

Los microplásticos se definen como polímeros sintéticos con dimensiones menores a los 5mm (*European Food Safety Authority*). Si la partícula es aún menor, con un tamaño inferior a 0,1µm, se consideran nanoplasticos^[1], aunque otros artículos proponen que sean materiales con alguna de sus dimensiones entre 1 y 1000 nm^[3].

Existe una clasificación de microplásticos entre primarios, aquellos que existen como tal desde su producción (por ejemplo, en productos de belleza, o aditivos en detergentes), y secundarios, que se exponen a diversos efectos que pueden alterar plásticos existentes, dando lugar a microplásticos^[1].

La clara dependencia de las actuales sociedades de consumo en los plásticos hace muy difícil su eliminación de la vida cotidiana, si bien es cierto que cada vez crece la necesidad de investigar nuevas formas de control y monitorización, bien sea por interés sanitario (saber si las aguas son aptas para consumo humano, si hay toxicidad en los pescados que se van a vender en los mercados...) o por interés ambiental (polución y posibles cambios en los ecosistemas).

Nuevas metodologías deben surgir para satisfacer esa necesidad de control, con unos parámetros adecuados al propósito.

1.2.- Detección y caracterización de los microplásticos. Técnicas de separación, preconcentración y caracterización comúnmente empleadas

La gran variedad de plásticos que existen en la actualidad, junto con las diversas condiciones en las que se encuentran, suponen un reto para su detección y correcta caracterización.

A menudo, las matrices dificultan el análisis, siendo vital disponer de procedimientos adecuados de toma de muestra y separación de estos materiales. En el caso de muestras medioambientales, como las provenientes de aguas de río, mares, o incluso aguas residuales provenientes de áreas residenciales, estas pueden contener elevadas concentraciones de materia orgánica que pueden interferir en la identificación de los plásticos. En función del grado de complejidad de la muestra, como sedimentos, suelos o biota, las etapas previas suelen incluir digestiones previo a su análisis para eliminar la mayor parte de los componentes de la matriz.

1.2.1. Técnicas de separación. Aislamiento de los microplásticos

Algunas estrategias habituales utilizadas para la separación de microplásticos son las basadas en diferencia de densidad^[4]. Así, la baja densidad de la mayoría de materiales plásticos abre la posibilidad de hacer uso de disoluciones de mayor densidad, para separarlos tras un tiempo de agitación. Plásticos como LDPE (polietileno de baja densidad) y PP (polipropileno), pueden ser separados mediante el uso de disoluciones saturadas de NaCl, que ofrecen las ventajas de ser muy baratas y no ser tóxicas. En la tabla 1 se recogen otras disoluciones que se utilizan con el mismo fin, así como el rango de densidades y materiales que pueden ser separados. En general, según aumenta la densidad del plástico, también lo hace la dificultad de la separación mediante este procedimiento de agitación.

Disolución saturada	Rango de densidades	Plásticos separados	Problemas asociados
NaCl	<1,20 g/cm ³	LDPE, PP	Rango de aplicación
Politungstato de sodio	1,15-1,60 g/cm ³	PVC, PET, Nylon	Precio
ZnCl ₂	Casi completo	Casi todos	Toxicidad, precio

Tabla 1. Disoluciones habitualmente empleadas para la separación de plásticos.

Otra estrategia que permite obtener una fracción de microplásticos homogénea en un rango de tamaños entre los mm y los cientos de micras, es el uso de tamices y filtros. La elección del tamaño de malla o de poro permite la separación por tamaños de las partículas. En general se realizan filtraciones secuenciales para evitar problemas de saturación de los filtros de menor tamaño de poro. La filtración a vacío es habitual si se usan las disoluciones saturadas mencionadas anteriormente en la tabla 1, debido a que pueden contener partículas de plásticos en flotación, que se pueden retener en estos sistemas.

1.2.2. Digestiones. Eliminación de materia orgánica

Como se ha mencionado anteriormente, suele ser habitual encontrar materia orgánica en las muestras recogidas, lo cual es un problema a la hora de la identificación y caracterización de los microplásticos mediante las técnicas instrumentales comúnmente empleadas. Un procedimiento habitual para reducir el número de interferencias suele ser la purificación mediante digestión. Haciendo uso de H_2O_2 al 30-35% (v/v) se obtienen resultados satisfactorios a temperaturas de 50°C en incubación, oxidándose casi la totalidad de la materia orgánica. Aunque el uso de peróxido de hidrógeno es simple y efectivo, presenta problemas de degradación de ciertos polímeros (en concreto, Nylon) o de cambio de color, como pasa con el PET. Existen alternativas más eficaces, como la realización de digestiones ácidas (HCl, HNO_3) o básicas (NaOH, KOH), aunque estos procedimientos suelen dañar los polímeros. Otra alternativa la constituye la digestión enzimática (usando por ejemplo tripsina o proteinasa K), obteniéndose buenos resultados sin dañar en este caso los polímeros.

1.2.3. Técnicas de preconcentración

A pesar de que muchas muestras provenientes del medio ambiente contienen una elevada cantidad de plásticos, la fracción de partículas de tamaño micro e inferiores suele ser muy pequeña, siendo vital la incorporación en estos casos, de una etapa de preconcentración. Dependiendo de la naturaleza de la posterior caracterización, se puede optar por diferentes estrategias^[5].

1.2.3.1. Filtración con membrana

Constituye el método más común y sencillo para preconcentrar una disolución de microplásticos. Se hace pasar la disolución por una membrana, para después pasar el sólido recogido a un volumen menor que el inicial. Es una operación muy simple, pero que tiene unas desventajas asociadas, como la posible introducción de contaminación por el uso de membranas poliméricas, o la imposibilidad de manejar grandes volúmenes (o flujos) de muestra, debido a la probable saturación del filtro.

1.2.3.2. Ultrafiltración

Es una mejora directa de la filtración con membrana. Hace uso de filtros de tamaño de poro mucho más pequeño (en rangos de 10-100 kDa) y de presiones (a menudo se incorpora flujo cruzado) para hacer pasar la muestra con mayor facilidad. Es capaz de manejar mayores cantidades de muestra y además actúa de una forma suave, puesto a que no elimina todo el solvente y se reduce la pérdida de partículas.

1.2.3.3. Evaporación de solvente

Se basa en el uso de rotavapores para retirar solvente por medio de evaporación, y por tanto concentrar así el analito. Es útil para solventes orgánicos y para concentrar aún más disoluciones provenientes de filtraciones (que tienen una limitación mayor del volumen que pueden reducir), aunque por lo general suele ser poco eficiente desde un punto de vista económico.

1.2.4. Técnicas de caracterización

Las técnicas más habituales en la caracterización de microplásticos se pueden dividir en físicas o químicas, según los parámetros que se tienen en cuenta^[1].

1.2.4.1. Técnicas de microscopía

La forma física más sencilla para la detección de microplásticos, es mediante observación directa al microscopio óptico. A tamaños no inferiores a las micras, puede obtenerse información simple como colores o presencia de impurezas, pero no debe olvidarse que, al depender de factores humanos, no se puede asegurar su validez. Para una óptima observación, la muestra debe haber sido acondicionada usando los procedimientos comentados brevemente con anterioridad, puesto que la materia orgánica puede dar lugar a errores (restos de algas secas o semillas se pueden confundir con microplásticos, por ejemplo). Se puede mejorar la identificación haciendo uso de tintes que se adhieran a la superficie de los plásticos de forma selectiva, aumentando su visibilidad.^[4]

Alternativamente a la observación directa con microscopio óptico, se puede utilizar la microscopía de barrido electrónico, la cual genera una imagen de la superficie de una muestra haciendo uso de un haz de alta densidad de electrones mediante barridos. Esta técnica ofrece excelentes resoluciones y permite la diferenciación de impurezas en la superficie. El acoplamiento con espectroscopía de rayos X permite obtener información sobre los microplásticos y los aditivos que contienen^[6] aunque sólo en aquellos casos en los que contengan un elemento que los diferencie claramente, puesto que la información obtenida es de composición elemental.

1.2.4.2. Técnicas espectroscópicas

Las técnicas de microscopía son muy eficaces para la detección de partículas, pero no permiten obtener información acerca de la naturaleza del analito, por lo que es importante la incorporación de técnicas espectroscópicas. La espectroscopía infrarroja por transformada de Fourier y la espectroscopía Raman son empleadas con mucha frecuencia por sus prestaciones y su fiabilidad. Ambas son técnicas vibracionales que se basan en la excitación molecular y la generación de una huella espectral característica para cada polímero. Ambas técnicas, aunque ofrecen unas prestaciones excelentes, presentan problemas asociados a interferencias, como la presencia de tintes artificiales que impiden su correcta identificación^[6].

1.2.4.3. Técnicas termométricas y cromatográficas

El análisis termoquímico es una opción empleada con frecuencia también. Se basan en métodos más tradicionales como podrían ser la termogravimetría o la calorimetría. De esta manera surgen métodos como TGA-DSC (*thermogravimetry with differential calorimetry scanning*), que se basa en intercambios de calor durante la transformación sólido-líquido del polímero, obteniendo información sobre su composición.

El tratamiento térmico de las especies plásticas y su posterior separación e identificación también se ha descrito para la caracterización de microplásticos, como en técnicas cromatográficas Py-GC-MS (*pyrolysis gas chromatography-mass spectrometry*) o TED-GC-MS (*thermal extraction desorption gas chromatography-mass spectrometry*), en las que se analizan

los productos generados tras el tratamiento térmico del polímero^[6]. Py-GC-MS suele ser la elección habitual, siendo capaz de identificar la composición de polímeros por la comparación de la degradación térmica (pirólisis) de la muestra con una biblioteca de referencia^[7]. El hecho de que no requiere pretratamiento de muestra y que se puede usar con múltiples tipos de polímeros simultáneamente, incluyendo aditivos, favorece el uso de esta técnica frente a otras alternativas, aunque no es capaz de dar buenos resultados con matrices complejas^[4].

1.3. Estrategias basadas en el uso de tintes fluorescentes para la identificación de microplásticos mediante microscopía de fluorescencia

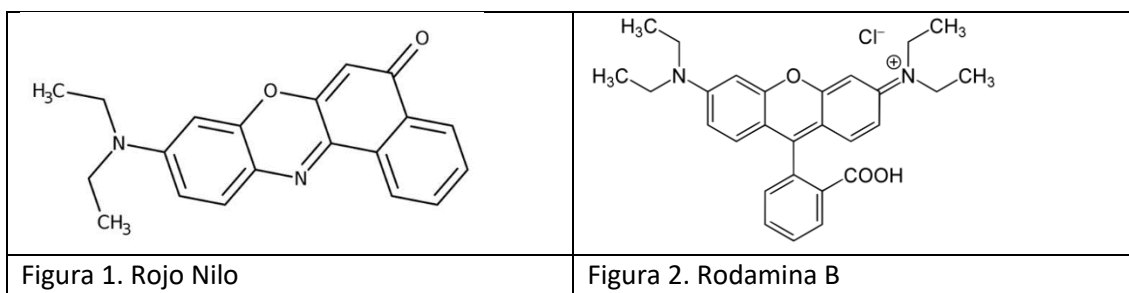
En el anterior apartado se ha comentado la posibilidad del uso de tintes lipofílicos, capaces de cubrir la superficie de las partículas de los plásticos debido a la naturaleza hidrofóbica imperante en ellos.

Esta técnica de tinción ha sido ampliamente utilizada en biología para marcar proteínas y DNA, desarrollándose con rapidez en los últimos años. El uso de microscopía de fluorescencia junto con estos tintes, unido a la aparición de nuevas cámaras y sensores de mejores prestaciones, permite la detección de señales fluorescentes muy pequeñas^[8].

La necesidad de desarrollo de metodología para microplásticos, ha llevado a la comunidad científica a investigar la posible aplicación de tintes para el análisis también de polímeros^[9].

De las distintas especies fluorescentes, se han descrito en la bibliografía como tintes para marcar polímeros el Rojo Nilo ($C_{20}H_{18}N_2O_2$, 9-(diethylamino)benzo[a]phenoxazin-5-one), y la Rodamina B ($C_{28}H_{31}ClN_2O_3$, cloruro de [9-(2-carboxifenil)-6-dietilamino-3-xanteniliden]-dietilamonio).

El Rojo Nilo es un tinte lipofílico cuyo espectro de emisión cae en la zona del rojo (aproximadamente 550-555nm para excitación y 637-642nm para emisión), y su estructura se muestra en la figura 1. Su solubilidad es reducida en agua, por lo que sus disoluciones deben prepararse en un disolvente orgánico, siendo el más habitual la acetona.



El Rojo Nilo permite la tinción de PE, PS, PVC y PET. Resultados de estudios demostraron que la señal fluorescente se mantiene estable durante largo tiempo (hasta 2 meses)^[4].

Por su parte, la Rodamina B es un marcador fluorescente en medio acuoso, empleado con frecuencia de la industria textil. Su espectro de excitación tiene un máximo en 546nm y el de emisión en 568nm. La estructura del tinte se muestra en la figura 2.

Algunos estudios^[9] han usado Rodamina B para marcar partículas de PS, testándose su eficacia en distintos medios, tales como agua destilada, etanol o acetona, y su capacidad para disolverse en ellos.

Existen más tintes con capacidad de marcar polímeros comunes (como podrían ser PS, PE, PVC y PET), como podrían ser la fluoresceína isofosfato o la safranina T^[4].

1.4. Alternativas para la detección de microplásticos de menor tamaño y nanoplasticos.

Tal y como se ha puesto de manifiesto a lo largo de los apartados anteriores, la detección de plásticos con tamaños inferiores a unas pocas micras mediante las técnicas habitualmente utilizadas en la caracterización de microplásticos de mayor tamaño resulta problemática. Por este motivo se ha planteado el uso de técnicas analíticas basadas en la separación de tamaños en el orden de los nanómetros para ser aplicadas en este tipo de análisis. Así, se ha descrito el uso de la ultrafiltración^[10] para la detección de nanoplasticos en aguas del Atlántico Norte, utilizando técnicas de dispersión de luz dinámica (DLS) para confirmar la presencia de nanopartículas, mientras que la identificación de su composición química se llevó a cabo mediante Pyr-GC-MS.

Otras técnicas que se utilizan habitualmente en la caracterización de nanopartículas también se han propuesto para la detección de nanoplasticos, como puede ser el fraccionamiento en flujo mediante campo (FFF), o técnicas de dispersión de radiación^[11], aunque estas técnicas deben combinarse con aquellas que permitan confirmar la naturaleza química de la especie detectada.

1.5. Técnicas de ultrafiltración. Técnicas de fraccionamiento en flujo mediante campo de flujo asimétrico (AF4). Fundamentos y aplicaciones al análisis de nanopartículas.

La ultrafiltración (UF) es una técnica que une la filtración con el uso de fuerzas centrífugas y filtros de membranas nanoporosas del rango de 1-100 kDa. Se obligan a pasar las partículas por la membrana mediante las fuerzas centrífugas. Es una técnica similar a la diálisis, pero más rápida, porque no depende de la difusión de las especies^[12].

El interés de este método es que permite la recuperación de ambas fracciones, lo que permite el aislamiento de las nanopartículas del resto de componentes de la matriz de tamaño inferior al establecido por el tipo de filtro. Un esquema se muestra en la figura 3.

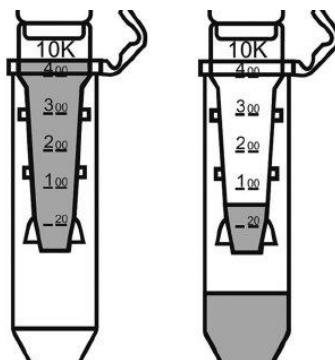


Figura 3. Funcionamiento tubo de ultracentrífuga.

El fraccionamiento en flujo mediante campo (FFF) y en particular aquella basada en el uso de un campo de flujo asimétrico (AF4), es una técnica de separación en continuo que permite llevar a cabo separaciones de partículas en el rango de tamaños comprendidos entre 1 nm y 50 μm . Se basa en el fraccionamiento de los componentes de la muestra líquida en el interior de un canal fino y alargado en el que no hay fase estacionaria, en el que el portador circula en régimen laminar y la retención se produce por efecto de un campo externo (un caudal en el caso del AF4) que actúa en perpendicular al flujo laminar del canal^[12]. Su funcionamiento se muestra en la figura 4.

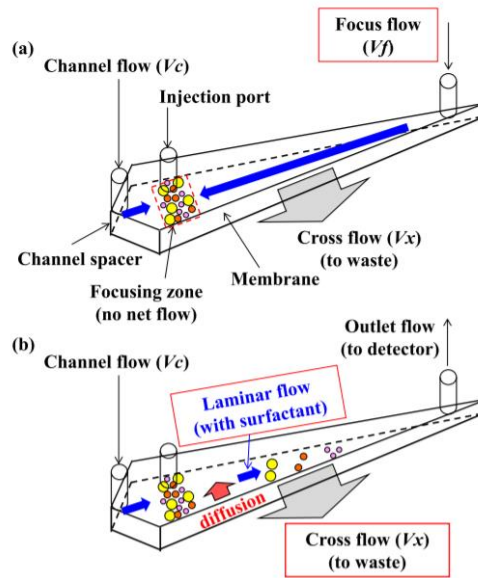


Figura 4. Funcionamiento AF4 en la fase de focalización (a) y en la fase de elución (b).^[13]

El perfil de concentraciones de la nube de partículas viene determinado por dos factores: la propia difusión de las partículas en el canal y la velocidad inducida por el flujo cruzado aplicado. Como consecuencia del perfil de flujo laminar parabólico, se obtiene el tiempo de retención. El tiempo de retención es directamente proporcional al caudal perpendicularmente aplicado e inversamente proporcional al coeficiente de difusión de las especies separadas.

Partículas de mayor diámetro saldrán a mayores tiempos de retención, lo que produce una separación de menor a mayor tamaño, como muestra la figura 5.

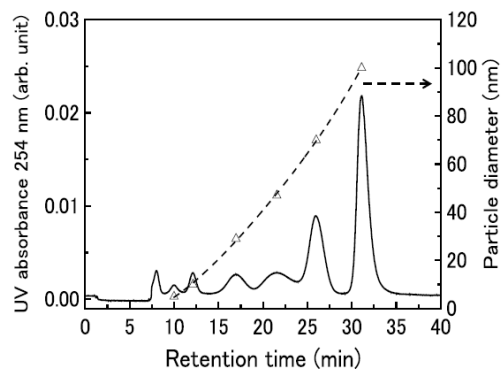


Figura 5. Fractograma de AF4. Relación entre tamaño de partícula y tiempo de retención.^[13]

2.- Objetivos

El objetivo general de este trabajo de fin de grado es el estudio de la viabilidad de distintas estrategias basadas en el uso de tintes fluorescentes para la detección de micro- y nanoplásticos en muestras medioambientales. Este objetivo general requiere del desarrollo de unos objetivos específicos que pueden resumirse en:

- 1.- Estudio de las condiciones experimentales en las que puede llevarse a cabo la tinción de distintos plásticos para su posterior detección.
- 2.- Desarrollo de un procedimiento para la separación de los micro- y nanoplásticos del exceso de tinte utilizado mediante técnicas basadas en ultrafiltración y en fraccionamiento en flujo mediante campo de flujo.
- 3.- Detección de los micro- y nanoplásticos teñidos mediante fluorescencia molecular o espectrometría de absorción molecular UV-Vis.

Estos objetivos científicos vienen acompañados con el desarrollo necesario de unos objetivos docentes, centrados en la búsqueda y gestión de bibliografía científica, el trabajo experimental en un laboratorio de investigación, con técnicas avanzadas como el fraccionamiento en flujo, el tratamiento de los datos obtenidos y la redacción de una memoria que resuma las principales conclusiones obtenidas.

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)
- Equipo AF4 con detector UV-vis (Postnova Analytics AF2000 focus)
- Micropipetas (Pluripet Kartell 100-1000µl, Labopette 10-100µl)

3.1.2 Aparatos y material

- Baño de ultrasonidos
- Centrífuga Thermo Multifuge X1R
- Tubos para ultrafiltración con tamaño de poro de 10kDa
- Sistema de filtración a vacío
- Botellas de 1l para almacenar fase móvil tras filtración
- Jeringa desmontable con filtros de policarbonato intercambiables
- Filtros externos de disco para jeringa
- Tubos con faldón
- Viales de 10ml
- Pipetas pasteur
- Vasos de precipitados
- Cubetas de cuarzo

3.1.3. Reactivos

- Rojo Nilo en polvo comercial
- Rodamina B en polvo comercial
- Acetona para uso analítico
- Metanol para uso analítico
- Agua ultrapura Milli-Q
- Suspensión de nanopartículas PS 200nm (Sigma-Aldrich)
- Hidróxido de potasio en perlas
- Surfactante Novachem (Postnova Analytics)

3.1.4. Muestras

- Ralladura de PP proveniente de la tapa de una caja de CDs y molida posteriormente
- Agua procedente del río Alcanadre tomada el 24 de mayo de 2021 en Flumen de Albalatillo. La muestra se conservó en un recipiente de vidrio cerrado a una temperatura de 4 °C hasta su análisis.

3.2 Procedimientos iniciales y de preparación

3.2.1. Preparación de suspensiones diluidas de partículas de poliestireno (PS) a partir de la suspensión patrón.

El patrón inicial tiene una concentración aproximada de $5,5 \times 10^{12}$ partículas/ml y está suspendida con un tensoactivo para su estabilización. Para proceder a su dilución, se sonica durante un minuto en baño de ultrasonidos la suspensión, tomando a continuación el volumen correspondiente mediante micropipeta y se añade a un vial limpio y seco, y se pesa en balanza analítica tras tarar el peso del vial. Se añade agua ultrapura al vial hasta 3 gramos (equivalente a 3ml totales). Se obtiene así una disolución 1:100 del patrón inicial, con una concentración $5,5 \times 10^{10}$, que se conservó en nevera para minimizar problemas de degradación. Suspensiones más diluidas (1:10 respecto de ésta, y 1:1000 respecto al patrón) se prepararon a partir de esta suspensión intermedia, siguiendo el mismo procedimiento.

3.2.2. Preparación de una disolución inicial 1g/l de Rojo Nilo

El procedimiento consiste en tomar la cantidad de masa adecuada del RN (3 mg) y tras pesarla en balanza analítica, se disuelve en 3 mL de acetona.

La disolución se almacena en nevera en un vial recubierto con papel de aluminio para evitar el contacto con la luz.

3.2.3. Preparación de una disolución inicial de 1g/l de Rodamina B

Se sigue un procedimiento análogo al de preparación de Rojo Nilo, con la diferencia de que la Rodamina B es soluble en agua. Se emplea agua ultrapura y se almacena en vial recubierto con papel de aluminio.

3.2.4. Preparación de una suspensión de polipropileno (PP)

En primer lugar, se procedió a rayar una tapa de una caja de CD para obtener pequeños fragmentos de plástico, para a continuación someter este material a una reducción de tamaño mediante un molino de bolas. El material que se utilizó para el molido fue acero inoxidable y se molió durante 2 min a 20 rpm. Se introdujeron 200mg del material molido en un tubo de 50 mL y después se añadieron 40ml de agua, medidos por pesada en balanza analítica. La suspensión se sometió a agitación manual durante unos 30 segundos antes de tomar cualquier alícuota de suspensión para homogeneizar el contenido.

3.2.5. Preparación de una disolución de PP para ensayo

Con el fin de eliminar las partículas más grandes, que podrían obturar algunas conducciones del sistema de AF4, se hace uso de una jeringa con filtro de policarbonato de tamaño de poro de 1 μm . Se recoge la suspensión filtrada en un vial, conservándose en nevera.

3.3. Procedimiento de tinción de los nanoplásticos con Rojo Nilo y con Rodamina B

Se toma un volumen de tinte con micropipeta y se añade a un vial recubierto con papel de aluminio. En los experimentos iniciales se usaron concentraciones finales de 50 y 10 mg/l, aunque a partir de la bibliografía se optó por reducirlas, realizando diluciones 1:30 sobre las de 50 y 10 mg/l. En el caso de la preparación de la concentración de 50mg/l, se partió de la disolución inicial de 1g/l de tinte, se tomaron 150µl con micropipeta, medidos por pesada en balanza. Se añaden al mismo vial 300µl de disolución intermedia de nanoplásticos (dilución 1:100) y se lleva a un volumen final de 3ml con agua Milli-Q. De la misma forma se procede con el resto de concentraciones, tomando el volumen correspondiente y llevándolo a un volumen final de 3 mL.

Una vez se tiene el vial con las partículas de PS y el tinte, se agita para facilitar la mezcla homogénea, y se lleva a un baño de ultrasonidos. durante 8 minutos (aunque se probaron otras duraciones durante la experimentación), observando que la suspensión no se caliente.

3.3.1. Procedimiento para el aislamiento de la fracción nanoparticulada de plásticos tras la tinción mediante ultrafiltración

Se utilizaron filtros de ultrafiltración de 10 kDa de tamaño de poro. Este tamaño retiene las nanopartículas de PS y de PP, mientras que permite el paso de las moléculas de tinte, tanto Rojo Nilo como de Rodamina B. Se acondicionan los tubos pasando 2ml de agua ultrapura a 3500 rpm durante 5 minutos. Una vez finalizado el proceso, se retiran los tubos y se desecha el agua.

A continuación, se toman 2 ml de la suspensión de las nanopartículas de plástico con el tinte y se añaden al tubo con filtro, sometiéndolo al mismo procedimiento de centrifugación bajo las mismas condiciones descritas anteriormente, y realizando una serie de lavados que se esquematizan en la figura 6.

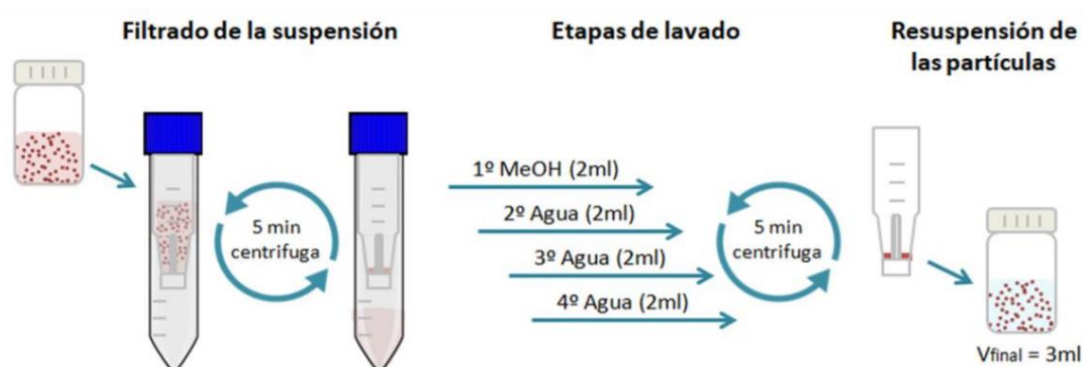


Figura 6. Etapas de ultrafiltración.

En el primero se añade metanol al tubo (que contiene las partículas teñidas) y se lleva a centrifugar. Se retira el metanol que pasa el filtro y después se realiza la misma operación, pero por triplicado utilizando agua ultrapura para el lavado. En el filtro deberían quedar las partículas teñidas, tras los lavados, libres de tinte. Todo el tinte que quede se considera que está unido superficialmente a las partículas.

Se recupera el pequeño volumen donde han quedado las partículas y se resuspenden en agua ultrapura hasta un volumen final de 3ml.

Una vez realizado el lavado y reconstitución de la suspensión de las nanopartículas de plástico, las medidas se realizaron en un intervalo inferior a 24 h.

3.4. Medidas en Espectrofotometría de Absorción Molecular UV-Vis

Se realizaron barridos desde 200nm hasta 800nm, con intervalos de medida de 0,2nm, y una velocidad de escaneo de 400nm/min.

3.5. Medidas en Fluorescencia Molecular

Se trabaja con una cubeta de cuarzo para fluorescencia. Se trabajó con una ganancia del detector fija de 800 mV, con una anchura de rendija fija de 10nm, y las medidas se hicieron en conjunto con Absorción Molecular UV-Vis, fijando primero la longitud de onda de excitación según el máximo encontrado en UV-Vis. Finalmente, en función de los máximos encontrados, se afinan las longitudes de onda para encontrar los máximos reales haciendo nuevos espectros.

Durante el manejo del equipo de AF4, se usó fluorescencia molecular acoplada utilizando una célula de flujo.

3.6 Procedimiento de preparación del sistema de AF4

Como portador, se emplearon dos disoluciones: una disolución de surfactante Novachem al 0,02% (m/m) y agua ultrapura a pH 8, ajustando mediante la adición de hidróxido de potasio. El portador se filtra a través de una membrana de 0,45 μm .

Una vez concluida la purga del equipo, se debe acondicionar el canal y su membrana al portador.

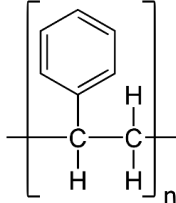
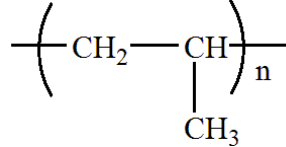
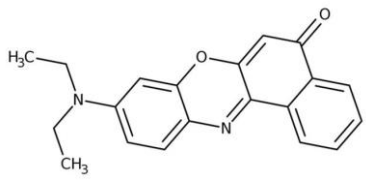
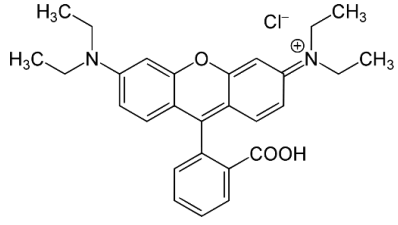
3.7 Medidas en sistema de AF4

Finalizado el procedimiento de purga y acondicionamiento del equipo, se configura un programa de flujo que consta de varias fases: una primera en la que forzamos la retención de todas las partículas mediante un alto flujo en la entrada *del canal* durante 5 minutos, una segunda de transición en la que se van cambiando los flujos poco a poco durante 1 minuto, y la tercera y última, la fase de elución, en la que se produce la separación de las especies introducidas, en la que las partículas van eluyendo en función de su difusión (tamaño) hacia la salida del canal, conectada con el detector.

El procedimiento de introducción de muestra consiste en introducir la disolución de muestra con una jeringuilla rellenándose el *loop* de inyección.

4.- Resultados y discusión

Se realizaron varios ensayos usando las partículas de PS y las partículas de PP junto con los dos tintes elegidos para estudio, el Rojo Nilo y la Rodamina B.

<p>Nombre común: Poliestireno Nombre IUPAC: Poli (1-feniletileno) Fórmula: $-(C_8H_8)-n$</p>	
<p>Nombre común: Polipropileno Nombre IUPAC: Poli (1-metiletileno) Fórmula: $-(C_3H_6)-n$</p>	
<p>Nombre común: Rojo Nilo Nombre IUPAC: 9-(diethylamino)benzo[a]phenoxazin-5-one. Fórmula: $C_{20}H_{18}N_2O_2$</p>	
<p>Nombre común: Rodamina B Nombre IUPAC: cloruro de [9-(2-carboxifenil)-6-dietilamino-3-xanteniliden]-dietilamonio Fórmula: $C_{28}H_{31}ClN_2O_3$</p>	

4.1. Caracterización de las propiedades ópticas de suspensiones de microplásticos objeto de estudio y de los compuestos de tinción Rojo Nilo y Rodamina B

Antes de comenzar con los ensayos de tinción de los microplásticos, se estudiaron las propiedades ópticas de ambos plásticos, a través de los espectros de absorción de sus respectivas suspensiones mediante EAM-UV-Vis, siguiendo el procedimiento descrito en el apartado 3.4. del experimental. Los espectros se presentan en la figura 7.

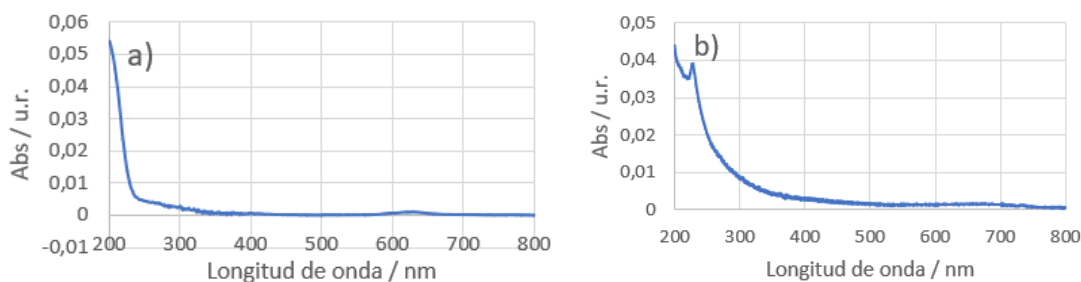


Figura 7. Espectros de absorción de las suspensiones de a) polipropileno y b) poliestireno.

El PS presenta absorción característica, con una banda que desciende desde los 200 hasta los 350 nm, por la presencia del anillo aromático en su estructura, y un máximo a 227nm, mientras que el PP presenta una banda para longitudes de onda inferiores a 230 nm, con un pequeño hombro en torno a 260 nm.

De igual forma, se estudió el espectro de absorción de los dos compuestos de tinción, rojo Nilo y rodamina B, que se presentan en la figura 8.

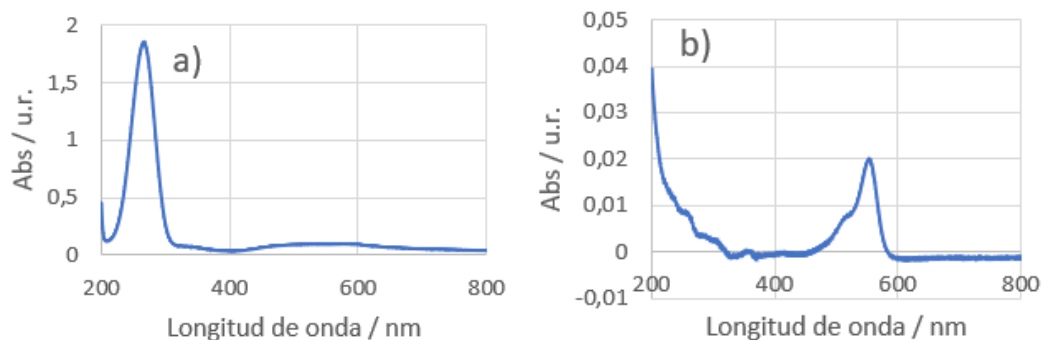


Figura 8. Espectros de absorción de a) Rojo Nilo y b) Rodamina B.

El RN presenta absorción a longitudes de onda de 266nm, y sobre 560-590nm, siendo esta banda la de mayor interés, puesto que se diferenciará de la absorción que presentan los microplásticos, y en general, de las bandas de absorción correspondiente a grupos funcionales comunes en las moléculas orgánicas. Sucede algo similar con la rodamina B, presentando un pico con máximo de absorción sobre 555nm, aunque el pico se extiende entre 500-580nm aproximadamente.

Se realizan del mismo modo los espectros de fluorescencia de los tintes, al ser ambos compuestos fluorescentes. En la figura 9. se muestran los espectros de excitación y emisión de la rodamina B.

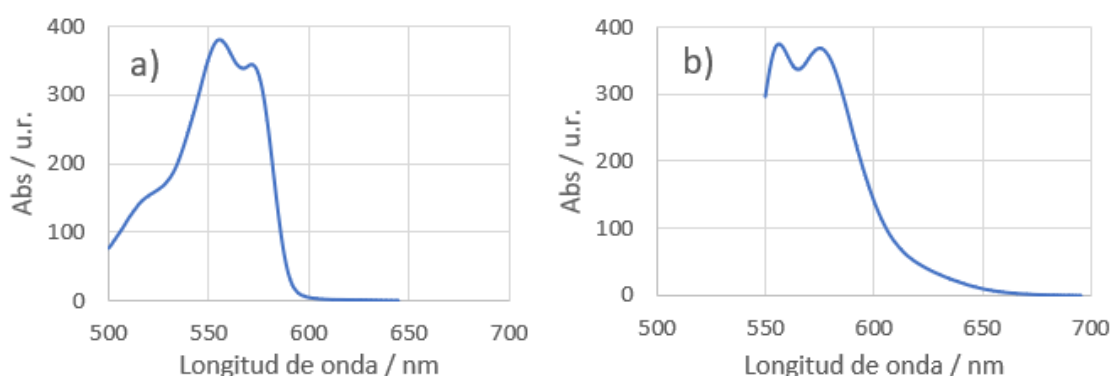


Figura 9. a) Espectro de excitación y b) emisión de la rodamina b (concentración 50 mg/L). Espectro de excitación medido a una $\lambda_{em} = 575$ nm y espectro de emisión a $\lambda_{exc} = 555$ nm.

Se obtienen máximos de excitación y emisión a 555 y 575nm respectivamente. Como se puede apreciar, los picos de los máximos se solapan con las señales de dispersión, debido a la proximidad de los máximos de excitación y emisión, así como por el uso de un fluorímetro con unas anchuras de rendija fijas de 10 nm.

En el caso del rojo Nilo, al realizar las medidas apenas se apreciaron máximos, al realizarse en medio acuoso (este compuesto presenta una solubilidad baja en agua, además de un efecto quenching o de desactivación del agua, que fue observado en un TFG anterior).

Por este motivo, se descarta RN como tinte apropiado para la medición en fluorescencia siguiendo el procedimiento propuesto.

4.2. Estrategias para el aislamiento de microplásticos teñidos. Ensayos de ultrafiltración (UF)

El proceso de tinción requiere de una etapa de separación que permita aislar los microplásticos teñidos del propio tinte. Sin esta separación previa no será posible identificar la presencia de los microplásticos a través de la absorción o fluorescencia característica del mismo, al solaparse con la de la propia molécula libre. En primer lugar, se estudió la posibilidad de utilizar un sistema de ultrafiltración con tamaños de poro de membrana que permitan retener las micropartículas de plástico y dejar pasar las moléculas de tinte, por lo que se trabajó con membrana de 10 kDa. El procedimiento se describe en el apartado 3.3.1. del experimental. Una vez eliminados los restos no deseados, se recoge la fracción que quede en el compartimento de muestra. Esta disolución estaría libre de tinte no asociado.

4.2.1. Ensayos con PS

Para estudiar la recuperación en el proceso de ultrafiltración y posterior resuspensión de los microplásticos, se midió la absorbancia en el máximo para una disolución antes del ultrafiltrado, y después, resuspendiendo la cantidad remanente en el mismo volumen inicial, de forma que no haya ningún proceso de dilución. Se realizó la comparación entre una disolución ultrafiltrada y otra que no lo ha sido (figura 10), para comprobar la cantidad de partículas que se pierden en el proceso. Los resultados se muestran en la tabla 2.

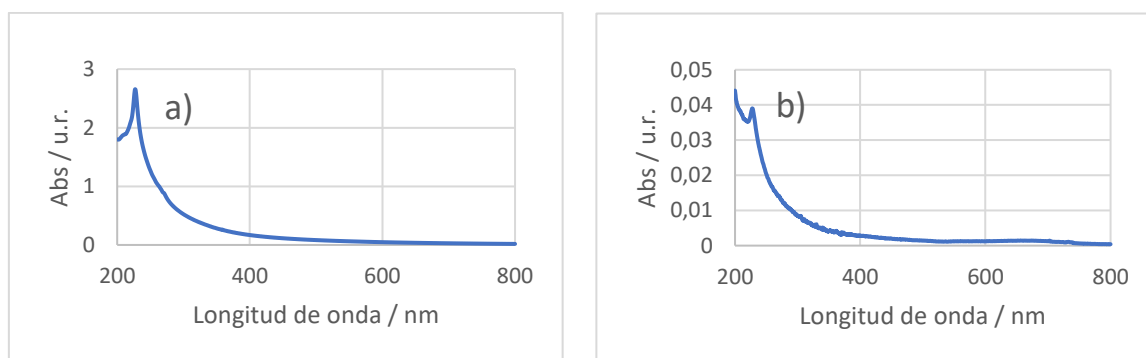


Figura 10. Comparación entre una disolución de PS a) sin someterse a ultrafiltración y b) tras ultrafiltración.

	Abs (254 nm)	Recuperación / %
Suspensión de PS	1,169	
Suspensión de PS tras UF	0,01853	2

Tabla 2. Comparación señales obtenidas con/sin ultrafiltración y recuperación.

Comparando las señales, se observa que tan solo un 2% de las partículas son retenidas y resuspendidas de nuevo en el medio. Esto implica que la mayor parte de las partículas de PS se

quedan retenidas en el filtro, impidiendo una adecuada recuperación al tratar de resuspender las partículas tras la ultrafiltración. A pesar de esta baja recuperación, se siguió con este procedimiento, tratando de evaluar su eficacia en el aislamiento de los microplásticos de las sustancias utilizadas para la tinción.

Para ello se realizó un ensayo de tinción usando RN para ver el aspecto del espectro siguiendo el proceso de ultrafiltración y comprobar la eficacia de la eliminación del tinte libre (figura 11).

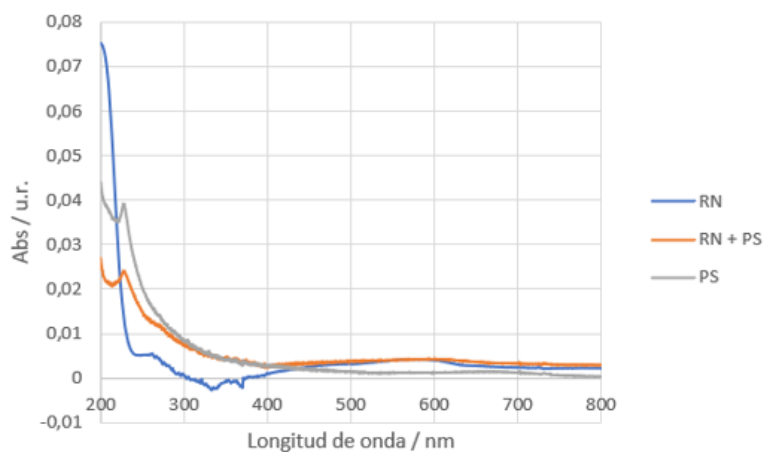


Figura 11. Comparación entre una disolución de RN (50mg/L), otra de RN + PS (tinción) y una de PS, tras UF

Comparando ambos espectros, se observa que el aumento debido a la presencia del RN en la suspensión de PS se debe a que durante el proceso de ultrafiltración y lavado no se produce la eliminación completa del tinte, y que una pequeña fracción queda en la disolución retenida, sin eliminarse de forma completa. La baja solubilidad del RN en agua causa que algunas partículas del tinte se queden retenidas en el filtro, siendo visibles a simple vista, y que sean incorporadas a la disolución final tras la resuspensión de los microplásticos retenidos.

Se decidió probar la Rodamina B como alternativa al Rojo Nilo, para ver si ofrecía mejores resultados al ser un tinte más hidrosoluble. De la misma forma, en la figura 12 se representan los espectros obtenidos al someter a una suspensión de PS tras el proceso de tinción y posterior ultrafiltración y lavado, junto con la de una disolución de la rodamina B sometida al mismo procedimiento.

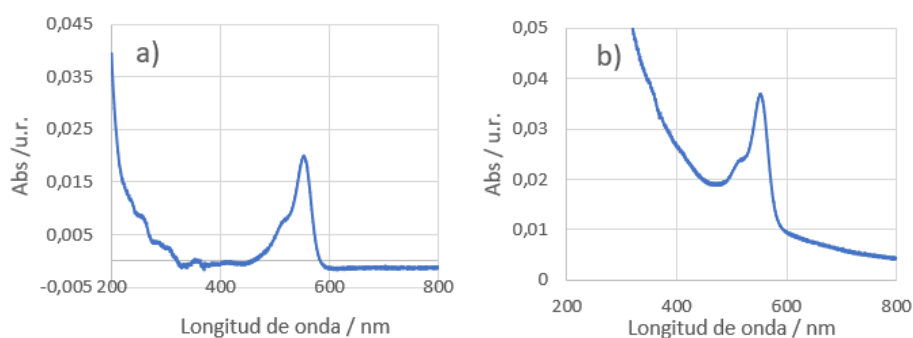


Figura 12. Espectros de absorción de a) una disolución de rodamina B de 50 mg/L en agua tras ultrafiltración y resuspendida en el mismo volumen; b) una suspensión de PS tras tinción y posterior separación mediante ultrafiltración, resuspendida en el mismo volumen.

Si observamos el espectro de la rodamina (sin PS) tras la UF, podemos observar que sigue apareciendo señal a 550nm (aproximadamente). Esto indica que el lavado no consigue eliminar totalmente la rodamina y que puede quedar como tinte libre.

Con el fin de tratar de reducir el tinte libre tras la UF, se modificaron las condiciones de la tinción de la muestra. Se aumentó el tiempo de contacto entre las partículas y el tinte (3 tandas de 10 minutos en el baño de ultrasonidos, en lugar de 1 sola de 8 minutos), y se redujo la concentración de tinte de 50 a 10ppm. Este cambio buscaba facilitar la eliminación del tinte en UF, a la vez que se obtiene una tinción similar a la obtenida a mayor concentración. Los resultados se presentan en la figura 13.

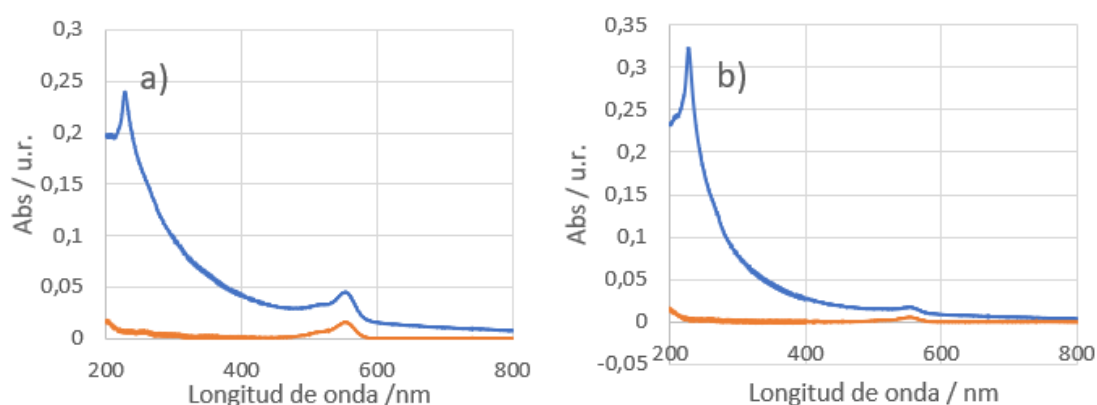


Figura 13. Espectros de tinción de poliestireno con rodamina B con concentraciones a) de 50 mg/L (1 sonicación de 8 minutos) y b) 10 mg/L (3 sonicaciones de 10 minutos)

Se observa que los espectros con menor concentración de tinte (10ppm) dejan menos tinte libre, pero a la vez, se reduce la efectividad de la tinción (líneas azules), generándose menos señal asociada a partículas.

No se obtiene un beneficio claro en el uso del programa largo, dado que, aunque se obtienen disoluciones más limpias (menos tinte libre), la señal disminuye también, siendo más susceptible al ruido instrumental. Aparte, el uso del programa corto ahorra tiempo, y también hace que la disolución se caliente menos en el baño de ultrasonidos, evitando posibles efectos térmicos, por lo que se prefirió seguir usando el programa habitual de sonicación, con una única tanda de 8 minutos.

Estos ensayos se replicaron utilizando las señales de fluorescencia, para comprobar si la ganancia en sensibilidad, unido a la eliminación de la señal debida a las micropartículas, permitía confirmar la tinción de los microplásticos. Los resultados se muestran en la tabla 3.

	Señal PS+Rod B / u.r.	Señal Rod B / u.r.	Señal neta
Tinción rodamina B 50mg/L	13,1	8,0	5,11
Tinción rodamina B 10mg/L	3,8	3,0	0,8

Tabla 3. Señales obtenidas mediante fluorescencia de disoluciones de PS y rodamina B tras ultrafiltración en los máximos encontrados anteriormente ($\lambda_{em} = 575 \text{ nm}$)

La tinción con 5 veces más concentración nos acaba dando aproximadamente 5 veces (comparación señal neta) más señal, lo cual es coherente con el aumento de la concentración de tinte utilizada.

Por tanto, en la tinción con rodamina B 50 mg/l se observa una mayor diferencia de señal entre el tinte solo y la combinación con el PS (comparación de ratios), lo que podría significar que la tinción es más efectiva a concentraciones más altas de tinte, aunque el aislamiento mediante UF no es efectivo del todo.

4.2.2. Ensayos con PP

Dado que no fue posible confirmar la tinción del microplástico de PS con los tintes que se propusieron al inicio del trabajo, se optó por trabajar con otro microplástico, como el PP. Aunque la tinción con rojo Nilo y rodamina se habían descrito en bibliografía para el PS, la presencia de tensoactivos en las suspensiones del PS comercial utilizado podía justificar la falta de afinidad entre la superficie del microplástico y las moléculas de tinte, por lo que se optó por utilizar un material plástico preparado directamente.

Así, se preparó una disolución de PP siguiendo el proceso indicado en el apartado 3.2.4. y 3.2.5. de experimental y se midió en absorción UV-vis tras proceder al proceso de ultrafiltración y resuspensión previo a los ensayos de tinción. El objetivo es establecer la recuperación de la separación para el microplástico una vez sometido al proceso de ultrafiltración. Los problemas asociados al uso de una jeringa con filtro para eliminar las partículas más grandes y la imposibilidad de ofrecer partículas de tamaño homogéneo (al provenir de un rallado manual y posterior molido) hace que cada disolución tenga una concentración de plástico final muy variable, lo que dificultaba el estudio sistemático de las condiciones de separación.

Se realiza un proceso de tinción usando PP (5 g/L iniciales) y los dos tintes usados con anterioridad, con el programa de 8 minutos de sonicación y 50 mg/L de tinte, registrándose los espectros de absorción UV-Vis. Los resultados se muestran en las figuras 14 y 15.

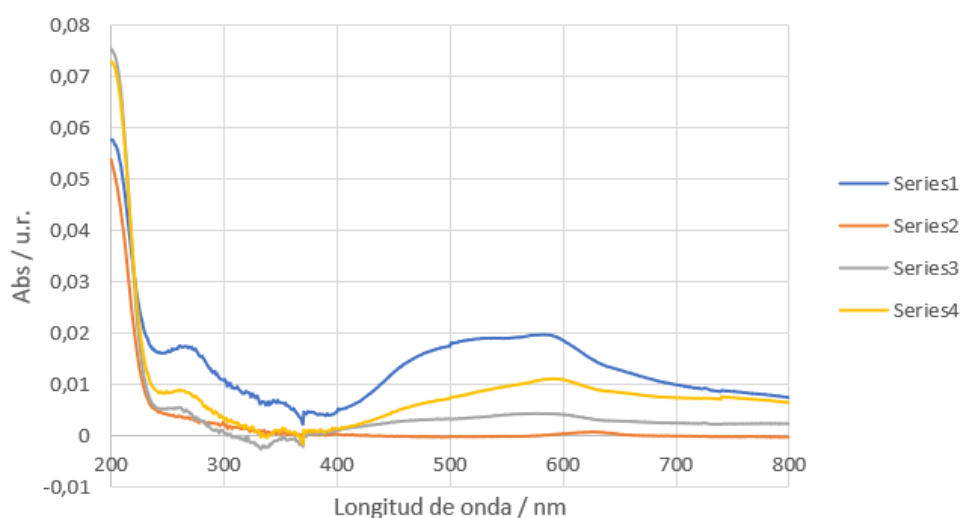


Figura 14. Espectros de tinción de PP con rojo Nilo y UF. Polipropileno (2), rojo Nilo (3) y dos réplicas de tinción (1 y 4)

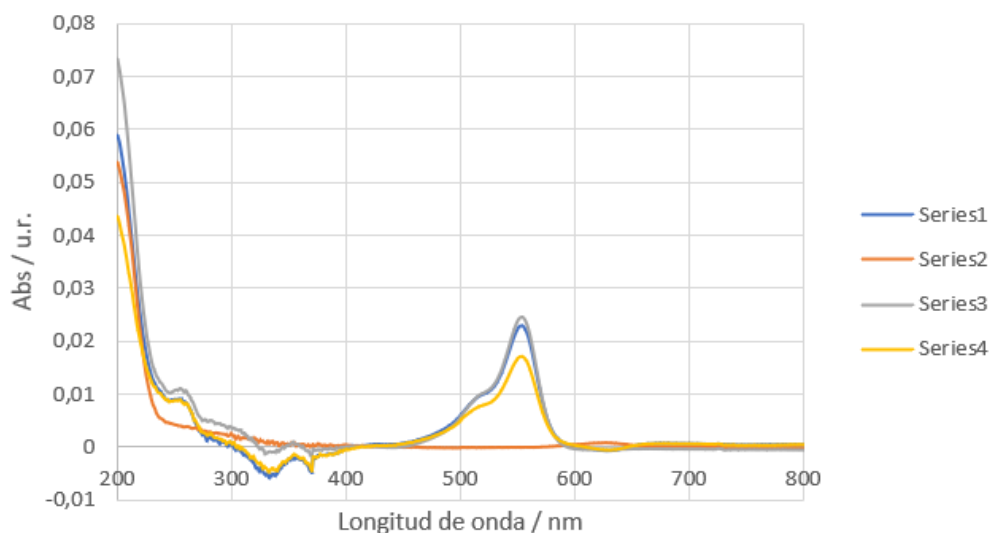


Figura 15. Espectros de tinción de PP con rodamina B y UF. Polipropileno (2), rodamina b (3) y dos réplicas de tinción (1 y 4).

Los resultados comparados de absorbancia en los máximos de absorción de rodamina y RN muestran por un lado cierta irreproducibilidad en los resultados (a partir de las réplicas de los ensayos de tinción) con desviaciones estándar relativas (DER) próximas al 40%, así como una mínima diferencia entre los ensayos con el tinte solo y los ensayos de tinción, fundamentalmente en el caso de la rodamina B, lo que vuelve a mostrar las dificultades de hacer una limpieza efectiva del tinte durante la ultrafiltración.

Los resultados con Abs-UV no fueron satisfactorios, realizándose ensayos en fluorescencia en paralelo. Se obtuvieron las siguientes señales (espectros en Anexos), que se recogen en la tabla 4:

	PP+Rod B	Rod B
Señales de FI / u.r.	325	380

Tabla 4. Señales de FI comparadas para disoluciones de rodamina B de 50 mg/L y disolución de PP tras tinción con rodamina B.

La comparación de las señales de la tinción, con la de los tintes sueltos, nos indica que no hay ganancia visible, lo cual nos hace pensar que la tinción del PP no es apreciable. Además, parece observarse una reducción de la señal de fluorescencia en los casos que se intenta realizar una tinción del PP, que podría deberse a la escasa reproducibilidad en la preparación de las suspensiones de PP.

Se puede concluir que el proceso de UF no consigue aislar de forma satisfactoria las partículas de plástico de tintes libres, además de reducir considerablemente la recuperación de las partículas tras el proceso de separación.

4.3 Estrategias de separación de microplásticos teñidos. Ensayos con AF4.

4.3.1 Caracterización de los compuestos sujetos a estudio en fractogramas de un AF4 y acoplamiento a fluorescencia.

Tras comprobar que la ultrafiltración no permitía aislar de forma satisfactoria los nanoplásticos, se abordó el uso del fraccionamiento en flujo (AF4). Esta técnica permite la separación por tamaños de las partículas y especies disueltas en una disolución, pudiendo ser empleado para separar el tinte libre (no asociado a las partículas de plástico tras la tinción), ya que son moléculas de menor tamaño respecto a los nanoplásticos que se quieren determinar. Como detectores se utilizaron tanto EAM-UV-Vis (seleccionando como longitudes de onda 256 nm (habitual en la detección de moléculas orgánicas) y 550 nm correspondiente al máximo de absorción de la rodamina B) como fluorescencia molecular (utilizando los máximos de excitación y emisión de la rodamina B), centrándose en el estudio del PS con rodamina B, al ser los que mejores resultados dieron en los ensayos anteriores.

En primer lugar, se introdujeron individualmente una suspensión de PS (figura 16 para señal UV-Vis y figura 17 para señal FI), y de rodamina B (figura 17 señal de FI) para comparar sus tiempos de elución. Se comprueba que el PS se eluye a un tiempo de 10 min, mientras la rodamina se eluye a tiempos menores, pero con una gran cola tal y como se aprecia en la figura 17, correspondiente a la señal de fluorescencia. En el caso del detector de UV-Vis apenas se aprecia señal (ver Anexo 2), lo que pone de manifiesto la mayor sensibilidad del detector de fluorescencia para este tipo de moléculas.



Figura 16. Fractograma de PS a 256nm (1) y 550nm (2) usando AF4.

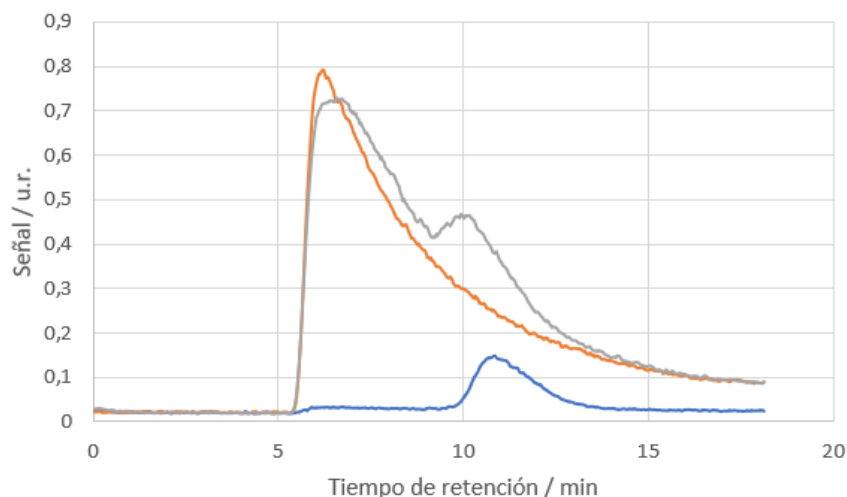


Figura 17. Comparación de las señales fluorescentes obtenidas con rodamina b (línea naranja), PS (línea azul) y la combinación PS + rodamina b (línea gris).

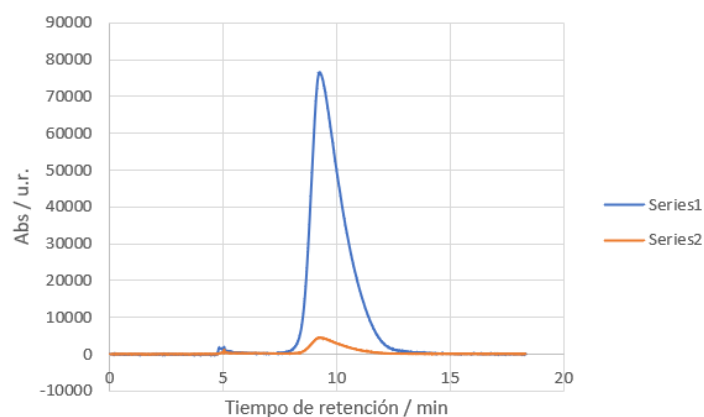


Figura 18. Fractograma de PS + rodamina b a 256nm (1) y 550nm (2) usando AF4.

En el caso de la señal fluorescente con la muestra de tinción (PS con Rodamina), se obtiene una señal en torno a 10-11 minutos que parece ser de PS asociado a rodamina (el retraso del pico respecto al observado en UV-Vis, es debido al acoplamiento con el equipo de fluorescencia, que se sitúa a continuación, y provoca que la muestra tarde un poco más en llegar al detector de FI). Debido a la señal que presenta el PS aislado (fractograma azul) es posible que esa señal observada (línea gris) se deba a la suma directa de señales de PS + Rodamina, al eluirse en la cola del pico de rodamina, por lo que existen dudas acerca de la naturaleza de la señal y de si realmente existe tinción.

4.3.2. Ensayos sobre una muestra de agua de río.

Ante los problemas surgidos para la correcta detección del PS tras su tinción mediante fluorescencia, finalmente se decide por realizar ensayos en una muestra de agua de río utilizando el detector de UV-Vis tras la separación mediante el canal del AF4. Se trabaja con una muestra de río a la que se le ha adicionado el estándar de PS para comprobar que se puede detectar. En la figura 20 se comparan los fractogramas del agua de río con la misma muestra a la que se le ha adicionado PS.



Figura 20. Comparación de una muestra de agua de río con (2) y sin adición de PS (1).

Se puede observar un pico correspondiente al PS en torno a 9 minutos. El uso de la señal a 256 nm permite identificar la señal del nanoplástico, con unos límites de detección del orden de 5-6 mg/L.

Tras comprobar el comportamiento del PS en el agua de río, y a pesar de que no se habían obtenido resultados concluyentes en los ensayos anteriores, se probó a realizar una medición de la muestra de agua de río con PS y someterla a un proceso de tinción con rodamina B. Esto permitiría aumentar la selectividad y sensibilidad del método al poder distinguir los posibles nanoplásticos presentes en el agua de otras especies que pudieran absorber radiación a estas mismas longitudes de onda y que se eluyeran en tiempos similares. Se debe recordar que, en una muestra más compleja como ésta, existen numerosas partículas de naturaleza muy variada que pueden interferir en la medición, puesto que existe una alta presencia de materia orgánica.

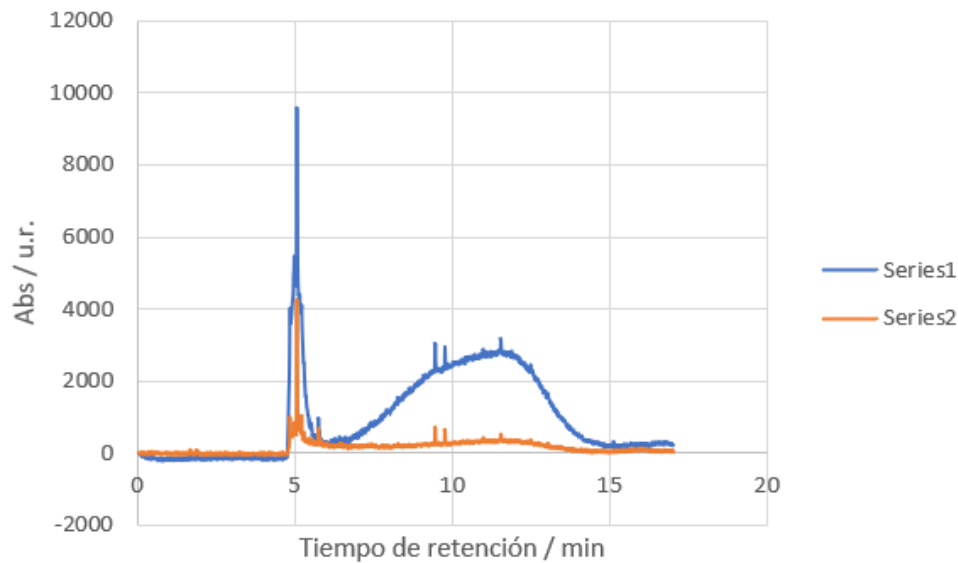


Figura 21. Fractograma de agua de río con PS y rodamina b a 256nm (1) y a 550nm (2)

En la figura 21 se observa la dificultad de interpretación del pico de PS a 256nm, que se ha convertido en un pico mucho más ancho y que aparece a un tiempo de retención mayor. La causa puede ser la formación de agregados y la interacción de la rodamina B con la materia orgánica existente en la muestra. No se aprecia una señal significativa a 550nm, lo que nos confirma que la tinción con rodamina B no nos aporta ningún beneficio a la hora de la identificación, puesto que la única señal es la que aparece al comienzo de la elución (tintes libres) y que el tinte no se ha asociado correctamente al PS que queremos identificar.

5. Conclusiones

De los distintos experimentos que se han ido realizando a lo largo del presente trabajo se puede concluir que ninguna de las estrategias utilizadas para la tinción de nanoplasticos ha permitido su identificación selectiva. La principal causa de estos resultados radica en la dificultad de separar los nanoplasticos del tinte que se encuentra en exceso tras el proceso de tinción.

Se ha trabajado con dos plásticos diferentes, poliestireno y polipropileno, con dos tintes diferentes, rojo Nilo y rodamina B, así como con diferentes técnicas de separación como son la ultrafiltración y el fraccionamiento en flujo mediante campo de flujo (AF4).

En el caso de la ultrafiltración, a la dificultad de separar el tinte se ha unido la baja recuperación obtenida, que no permite aislar de forma eficiente los nanoplasticos tras el proceso de tinción. Por este motivo, tampoco ha sido posible establecer si se produce una interacción entre la molécula de tinte y la superficie del nanoplastico. En ensayos realizados previos a este trabajo se comprobó que plásticos de mayor tamaño adquirirían coloración mediante su observación en microscopía óptica, pero sobre microplásticos depositados en un soporte sólido, y no directamente en suspensión.

A pesar de las dificultades inherentes al punto de partida del trabajo, el uso de AF4 ha permitido llevar a cabo la caracterización de un nanoplastico mediante su elución a tiempos definidos. Su aplicación práctica se ha demostrado mediante el análisis de este nanomaterial en un agua de río, con unos límites de detección de 5-6 mg/L.

A nivel docente, este trabajo me ha permitido aprender la sistemática de la investigación sobre un tema en desarrollo junto con la aplicación de destrezas y conocimientos asentados durante todo el grado. He podido experimentar de primera mano las dificultades de la investigación, junto con la posibilidad de no obtener resultados que confirmen las hipótesis iniciales, pero cada fallo nos ha permitido descartar ciertas ideas y avanzar en el trabajo.

6. Bibliografía

1. Alvim, CB; Mendoza-Roca, JA; Bes-Pia, A. Wastewater treatment plant as microplastics release source – Quantification and identification techniques. *Journal of Environmental Management* **2020**, 255. Art: 109739. DOI:10.1016/j.jenvman.2019.109739
2. [Alexy, P; Anklam, E; Emans, T; Furfari, A; Galgani, F; Hanke, G; Koelmans, A; Pant, R; Saveyn, H; Kluttgen, BS. Managing the analytical challenges related to micro- and nanoplastics in the environment and food: filling the knowledge gaps. *Food additives and contaminants part A – Chemistry analysis control exposure & risk assessment* **2020**. 37 (1). 1-10. DOI:10.1080/19440049.2019.1673905]
3. [Julien Gigault; Hind El Hadri; Stéphanie Reynaud; Elise Deniau; Bruno Grassl. Asymmetrical flow field flow fractionation methods to characterize submicron particles: application to carbon-based aggregates and nanoplastics. *Analytical and bioanalytical chemistry* **2017**. 409 (29). 6761-6769. DOI: 10.1007/s00216-017-0629-7]

4. [Lv L, Yan X, Feng L, Jiang S, Lu Z, Xie H, Sun S, Chen J, Li C. Challenge for the detection of microplastics in the environment. *Water Environment Research* **2019**, 93(1): 5-15. DOI: 10.1002/wer.1281]
5. [Christian Schwaferts, Reinhard Niessner, Martin Elsner, Natalia P. Ivleva. Methods for the analysis of submicrometer- and nanoplastic particles in the environment. *Trends in Analytical Chemistry* **2019**, 112, 52-65. DOI: 10.1016/j.trac.2018.12.014]
6. [Fytianos, G.; Ioannidou, E.; Thysiadou, A.; Mitropoulos, A.C.; Kyzas, G.Z. Microplastics in Mediterranean Coastal Countries: A Recent Overview. *J. Mar.Sci. Eng.* **2021**, 9 (1), Art: 98. DOI: 10.3390/jmse9010098]
7. [Florent Blancho, Mélanie Davranche, Hind El Hadri, Bruno Grassl, Julien Gigault. Nanoplastics Identification in Complex Environmental Matrices: Strategies for Polystyrene and Polypropylene. *Environmental science and technology* **2021**, 55 (13), 8753-8759. DOI: 10.1021/acs.est.1c01351]
8. [Waggoner, A; Taylor, L; Seadler, A; Dunlay, T. Multiparameter Fluorescence Imaging Microscopy: Reagents and Instruments. *Human Pathology* **1996**. 27 (5). 494-502. DOI: 10.1016/S0046-8177(96)90092-1]
9. [Tong, HY; Jiang, QY; Zhong, XC; Hu, XS. Rhodamine B dye staining for visualizing microplastics in laboratory-based studies. *Environmental Science and Pollution Research* **2021**. 28 (4). 4209–4215. DOI: 10.1007/s11356-020-10801-4]
10. [Ter Halle, A; Jeanneau, L; Martignac, M; Jarde, E; Pedrono, B; Brach, L; Gigault, J. Nanoplastic in the North Atlantic Subtropical Gyre. *Environmental Science and Technology* **2017**. 51 (23). 13689-13697. DOI: 10.1021/acs.est.7b03667]
11. [Correia, M; Loeschner, K. 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* **2018**. 410 (22). 5603-5615. DOI: 10.1007/s00216-018-0919-8]
12. [Francisco Laborda, Eduardo Bolea, Gemma Cepria, Maria T. Gomez, María S. Jimenez, Josefina Perez-Arategui, Juan R. Castillo. Detection, characterization and quantification of inorganic engineered nanomaterials: A review of techniques and methodological approaches for the analysis of complex samples. *Analytica Chimica Acta* **2016**. 904. 10-32. DOI: 10.1016/j.aca.2015.11.008]
13. [Itabashi, D; Murao, R; Taniguchi, S; Mizukami, K; Takagi, H; Kimura, M (Kimura, Masao). Determination of Size Distribution of Nanoparticles Using Asymmetric Flow Field-flow Fractionation (AF4). *ISIJ International* **2020**. 60 (5). 979–987. DOI: 10.2355/tetsutohagane.TETSU-2020-088]

7. Anexos

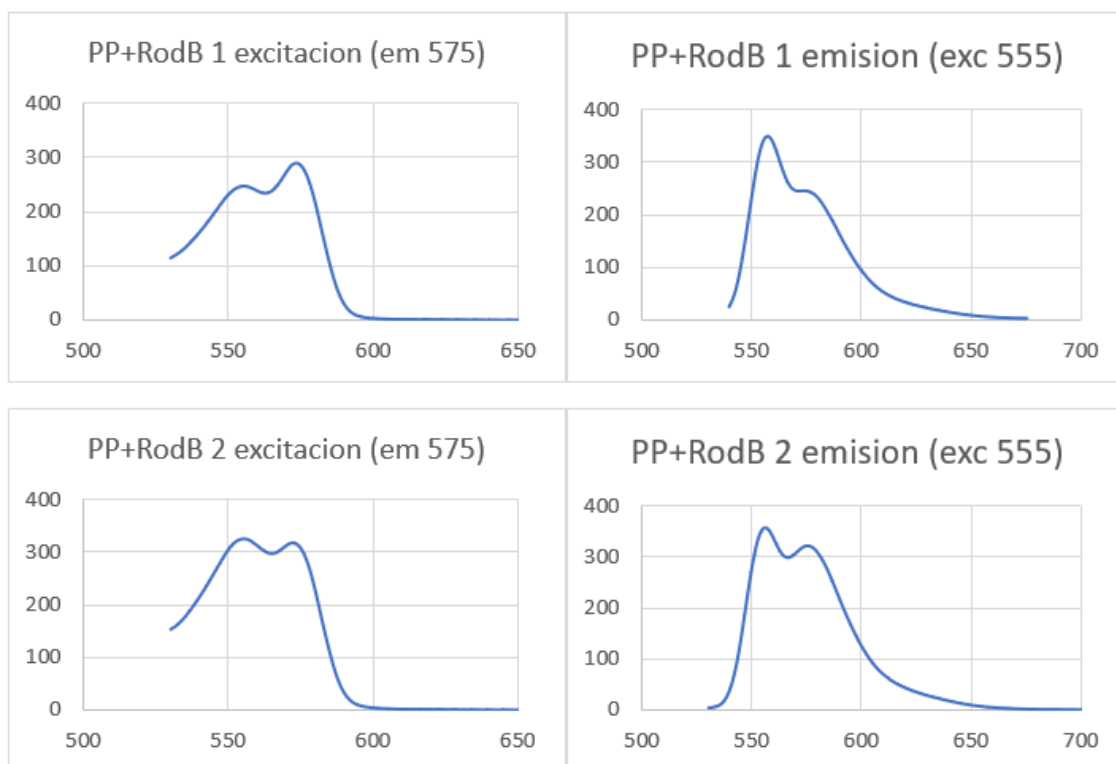


Figura anexa 1. Espectros de fluorescencia para la tinción de PP con rodamina B siendo a) excitación réplica 1 b) emisión réplica 1 c) excitación réplica 2 d) emisión réplica 2 ($\lambda_{em} = 575$ nm y $\lambda_{exc} = 555$ nm)

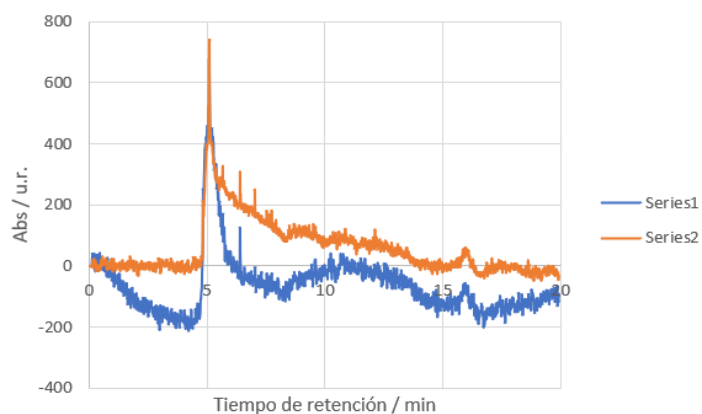


Figura anexa 2. Fractograma de rodamina b a 256nm (1) y 550nm (2) usando AF4.