



Facultad de Veterinaria
Universidad Zaragoza



Trabajo Fin de Grado en

Ciencia y Tecnología de los alimentos

DETECCIÓN DE MICROPLÁSTICOS A
TRAVÉS DE ICP-MS

ICP-MS FOR THE DETECTION OF
MICROPLASTICS

Autor/es

Carlos Vicente Prieto Serrano

Director/es

Martín Resano
Ezcaray Eduardo
Bolea Fernández

Facultad de Veterinaria

2022-2023

ÍNDICE

RESUMEN	1
ABSTRACT	1
INTRODUCCIÓN	2
METODOLOGÍA	6
CALIBRADO CON DISOLUCIONES IÓNICAS DEL ANALITO	6
CÁLCULO DE LA EFICIENCIA DE TRANSPORTE	10
DETERMINACIÓN DEL TAMAÑO DE PARTÍCULA	12
ENSAYO CON MUESTRAS REALES	20
CONCLUSIÓN	23
BIBLIOGRAFÍA	24

RESUMEN

El uso del plástico se ha visto incrementado de manera exponencial en los últimos años, siendo la industria alimentaria uno de los sectores más afectados por esta situación, lo que sitúa estos residuos en contacto directo con el organismo de las personas y suscita una evidente preocupación al respecto.

Se ha demostrado que los microplásticos tienen efectos nocivos sobre los seres vivos, alterando la microbiota intestinal y el comportamiento de las células. Sin embargo, a pesar de ello, no se ha llevado a cabo una regulación en materia legal para estas partículas puesto que la falta de métodos analíticos estandarizados ha dificultado el progreso en este aspecto.

Ante una situación como esta, es de vital importancia comenzar una búsqueda de metodologías realmente efectivas para la cuantificación y caracterización de residuos plásticos, pues los sistemas propuestos por el momento son en su mayoría incapaces de detectar partículas por debajo de un cierto rango. En este aspecto, el uso de ICP-MS en modo de evento único; ha demostrado recientemente que puede ser una técnica útil para ayudar en la caracterización de microplásticos, tal y como se comprueba en el presente trabajo.

ABSTRACT

The use of plastic has increased exponentially in recent years, with the food industry being one of the sectors affected by this situation, which places this waste in direct contact with people's bodies and manifests an obvious concern in this regard.

It has been shown that microplastics have harmful effects on living beings, altering the intestinal microbiota and the behavior of cells, however, despite this, no legal regulation has been carried out for these particles, because until to date, the lack of standardized analytical methods has hampered progress on these issues.

Faced with a situation like this, it is of vital importance to begin a search for really effective methodologies for the quantification and characterization of plastic waste, since the systems currently proposed are mostly incapable of detecting particles below a certain range. In this aspect, the use of single-event ICP-MS has recently demonstrated that can be a useful technique to help in the characterization of microplastics.

INTRODUCCIÓN

El plástico, gracias a sus propiedades, que le constituyen como un material ligero, versátil, de alta durabilidad y bajo coste de producción, se ha posicionado como uno de los recursos más ampliamente utilizados a nivel industrial en todos los ámbitos (Li y col., 2018).

Se estima que, aproximadamente el 60-80% de la basura generada actualmente es plástico, lo que, sumado a políticas ambientales inapropiadas y al desconocimiento social, ha provocado la diseminación y acumulación de estos residuos en el medio ambiente, comenzando así la preocupación en cuanto al nivel de exposición del ser humano (Ghosh y Saha, 2017).

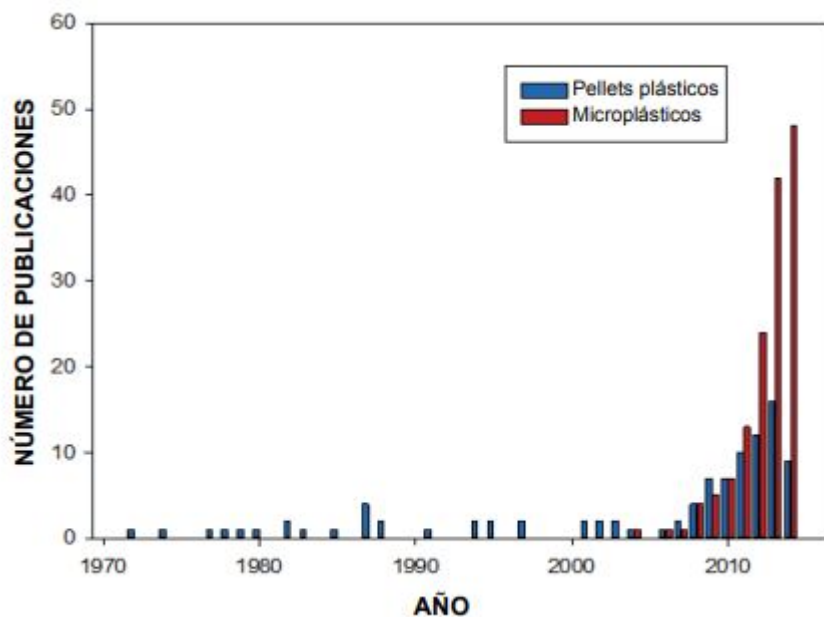


Figura1. Evolución de la publicación de artículos relacionados con microplásticos y pellets plásticos desde que se acuñaron los términos (Bollarín y Vicente, 2019).

Hasta hace poco, el estudio acerca de la contaminación por microplásticos se había centrado en los medios acuáticos y en los organismos allí presentes, pero el creciente número de alimentos listos para el consumo que salen al mercado ha puesto de manifiesto la relevancia que podrían cobrar también en estos productos, sobre todo debido a la potencial migración desde los envases a la matriz alimentaria (Kwon y col., 2020).

Es posible clasificar las partículas de plástico en función de su tamaño; las más grandes, denominadas macroplásticos, poseen un diámetro superior a 5 mm; las que se encuentran entre 1 μm y 5 mm son microplásticos (MPs) y las que tienen un diámetro inferior a 1 μm nanoplasticos (NPs) (Yalwaji y col., 2022).

El plástico es un material termosensible, por lo que, al someterse a altas temperaturas, puede ver aceleradas su degradación y la consiguiente liberación de partículas. Una gran variedad de productos es procesada en el interior de sus envases plásticos, como salsas, platos precocinados, zumos y otras bebidas, lo que puede dar lugar a una migración de MPs y NPs al alimento (Zangmeister y col., 2022).

Como ejemplo, un estudio publicado en la revista Nature Food en 2020 mostró que los biberones de polipropileno para fórmulas infantiles podían llegar a liberar hasta 16.200.000 partículas/L y que, al someterse a un proceso de esterilización, la liberación aumentaba significativamente, entre el 35 y el 84%. Se estimó que la exposición global potencial de los lactantes de hasta 12 meses a los microplásticos era, dependiendo de la región, de entre 14.600 y 4.550.000 partículas per cápita al día, lo que, teniendo en cuenta que se trata de una población especialmente vulnerable, denota la necesidad de evaluar el riesgo que suponen estos residuos y controlar su presencia para garantizar un correcto estado de salud (Li y col., 2020).

La inquietud que genera la existencia de estos contaminantes es razonable, pues actualmente se conoce que la acumulación de MPs y NPs en el organismo puede llegar a tener efectos nocivos; un reciente estudio realizado por el CSIC publicado en 2022 demostró, empleando modelos que reproducían las condiciones fisiológicas de la digestión humana, que la ingesta diaria estimada de microplásticos de PET, de 166 mg/día, tenía un efecto antibacteriano sobre algunos de los grupos microbianos más importantes de la función intestinal, como lo son *bifidobacterium* y *clostridium*, lo que podría favorecer enfermedades como el síndrome del intestino irritable y la enfermedad intestinal inflamatoria. En cambio, bacterias como *Escherichia* y *Shigella*, relacionadas con un efecto inflamatorio del intestino y consecuentemente, el cáncer colorrectal y la enfermedad de las arterias coronarias, parecieron verse incrementadas en número (Tamargo y col., 2022).

A día de hoy, no se dispone de mecanismos legales para regular el contenido en MPs y NPs en los alimentos, sin embargo, la Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria (EFSA) ha destacado ya en varias ocasiones la necesidad de desarrollar métodos analíticos estandarizados para identificar y cuantificar estos contaminantes en la cadena alimentaria. En un informe publicado por la EFSA en 2017, se destaca la presencia de MPs y NPs en alimentos como uno de los asuntos de investigación prioritarios en el área de seguridad de alimentos y piensos, siendo el objetivo de la propuesta caracterizar la exposición y peligros de las partículas plásticas en estos productos, pues se indica que la falta de métodos analíticos es causante de una escasez de datos al respecto (Aesan, 2021).

La falta de procedimientos universales y estandarizados puede suponer dificultades a la hora de seleccionar técnicas de muestreo y análisis, pero hay una serie de métodos analíticos comúnmente utilizados para la identificación y cuantificación de las partículas de plástico. La **inspección visual**, por ejemplo, es una de las técnicas más empleadas, consistente en observar las partículas de plástico a simple vista o mediante un microscopio, aunque con la desventaja de ser un proceso dilatado en el tiempo y que da lugar a interpretaciones subjetivas.

Algunos otros métodos empleados para este cometido son la caracterización mediante **espectroscopía Fourier-Transform InfraRed (FTIR)** y **espectroscopía Raman**, basados ambos en la interacción de la luz con las moléculas. El FTIR genera un espectro infrarrojo resultante del cambio en el momento dipolar y permite usarse en modalidades como la “reflexión total atenuada FTIR” (ATR-FTIR), que mejora la información sobre microplásticos irregulares o la “micro-FTIR”, que proyecta un mapa de alta resolución de la muestra. La espectroscopía Raman, en cambio, mide los cambios en la polarizabilidad de los enlaces químicos, aunque para su uso se requiere de filtros Raman de bajo fondo, lo que supone un desembolso muy elevado que limita el uso de esta técnica. El FTIR tiene una capacidad de detección limitada (límite de detección de 10 μm), el agua también se detecta mediante FTIR, por lo que es necesario eliminarla antes del análisis y no proporciona información adicional acerca de la presencia de aditivos en los plásticos. Por su parte, la espectrometría Raman, tiene un límite de detección mejor (aproximadamente de 1-2 μm), pero su mayor problema es la presencia de fondo fluorescente proveniente de impurezas de materia orgánica en las muestras, que puede dar lugar a resultados erróneos. Ambos métodos anteriormente descritos requieren de un considerable costo, tiempo y tratamiento de datos por parte de personal especializado. (Strungaru y col., 2018).

La cromatografía de gases/espectrometría de masas por pirólisis (Pyro-GC-MS) puede usarse también para caracterizar microplásticos, descomponiendo térmicamente los polímeros y crio atrapando y separando el gas formado en una columna cromatográfica, para identificar los compuestos por espectrometría de masas. Este método posee una limitación clara, pues no puede proporcionar información acerca del número, tamaño y forma de los microplásticos.

Un sistema que ofrece ciertas ventajas sobre Pyro-GC-MS es la **termoextracción y desorción acopladas con cromatografía de gases/espectrometría de masas (TED-GC-MS)**, que combina un análisis termogravimétrico con una extracción en fase sólida de la degradación plástica de los productos. Esta técnica permite emplear muestras de una masa considerable e identificar y cuantificar polímeros de matrices heterogéneas sin la necesidad de un proceso de

selección, pero nuevamente, está limitada en cuanto a la cantidad de información que puede ofrecer (Prata y col., 2019).

Como vemos, las técnicas anteriormente mencionadas están contenidas en cuanto al rango de tamaños en el que pueden medir, quedando fuera de su alcance los microplásticos y nanoplásticos más pequeños, por debajo de 100 nm, que son al mismo tiempo los más peligrosos, puesto que suponen un mayor riesgo de endocitosis y perturbación de las funciones celulares (Zhang y col., 2015). Teniendo en cuenta esto, un instrumento muy conveniente para esta labor, no solo por su capacidad de medir pequeñas partículas sino también por la gran cantidad de información que puede proporcionar es ICP-MS.

La **espectrometría de masas con plasma de acoplamiento inductivo** (ICP-MS) es una técnica analítica que posee un plasma de argón (Ar) a una temperatura de entre 7000 y 9000 K capaz de ionizar a cationes los átomos con un potencial de ionización inferior al del propio Ar, para posteriormente separarlos en función de su relación masa/carga. Esta técnica proporciona información sobre la concentración de una gran variedad de analitos en un amplio rango de concentraciones, pero se caracteriza por sus bajos límites de detección en el orden del nanogramo por litro (parte por trillón).

Inicialmente se creía, que este instrumento no permitiría analizar microplásticos (MPs), pues aparentemente no era capaz de medir el carbono debido a su baja eficiencia de ionización (1 – 5 %) y, ya que, al ser este elemento ubicuo en el entorno, presente en numerosas especies como CO₂, CO o CH₄ alrededor del plasma, la señal de fondo que produciría sería muy difícil de diferenciar de una señal generada por microplásticos individuales introducidos. Este último problema se daría al operar en modo *bulk*, en el que se parte de una disolución homogénea para medir su composición. Sin embargo, es posible analizar las partículas de forma individual si se utiliza el ICP-MS en modo de evento único (*single event*), de forma que la señal generada por una partícula aparezca en forma de pico sobre el fondo, obteniendo de ese modo una distinción clara y pudiendo extrapolar el tamaño de la partícula a partir del área del pico. Este modo de ICP-MS ha sido ampliamente utilizado para la caracterización de nanopartículas metálicas, en lo que se denomina “single-particle” ICP-MS (SP-ICP-MS), que fue introducido por primera vez por Degueldre y Favarger en 2003 demostrando que podía proporcionar información relevante de las nanopartículas, como su composición elemental, tamaño (diámetro esférico equivalente) y distribución de tamaño, concentración de partículas (partículas por mL) y concentración en masa (mg L⁻¹), además de permitir calcular el contenido iónico y el contenido de nanopartículas simultáneamente. En el contexto de MPs, esta técnica fue reportada por primera vez en un trabajo pionero de Bolea-Fernandez y col, 2020, basado en la caracterización de MPs de 1 y 2,5

μm de diámetro. Tras este trabajo otros autores han demostrado que es este enfoque es muy útil para la caracterización de MPs en productos de consumo (*Laborda y col, 2021*) y en muestras medioambientales (*Gonzalez de Vega y col. 2021*). En cuanto a la caracterización de nanoplásticos (NPs), más avances y estudios han de realizarse para utilizar este enfoque, ya que debido al alto fondo producido por otros compuestos de carbono presentes en la atmósfera o en el Ar utilizado para generar el plasma, los límites de detección no permiten por el momento la detección de NPs. Sin embargo, SP-ICP-MS, se ha utilizado para la detección de NPs mediante el marcaje de estos con otros metales (p. ej., Au) para mejorar su detección por ICP-MS (*Jiménez-Lamana y col., 2020*). Aunque se debe destacar que este último enfoque no permite obtener información de tamaño o de concentración en masa, ya que sólo proporciona información de concentración de partículas. Igualmente, la identificación del tipo de polímero no es posible mediante SP-ICP-MS, aunque es evidente que es una técnica prometedora para la detección y caracterización de MPs de pequeño tamaño ($<10 \mu\text{m}$) y NPs, y que puede convertirse en una técnica crucial para estudios de exposición y evaluación de riesgos.

METODOLOGÍA

CALIBRADO CON DISOLUCIONES IÓNICAS DEL ANALITO

Para la creación de las curvas de calibrado (10 mg L^{-1} – 200 mg L^{-1}) fueron empleados dos compuestos de carbono, el ácido tartárico ($\text{C}_4\text{H}_6\text{O}_6$) y el ácido cítrico ($\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_7$), buscando preparar una disolución de 1000 mg L^{-1} de C en 50 mL de agua ultrapura con cada uno, para posteriormente preparar otras 4 (200 mg L^{-1} , 100 mg L^{-1} , 50 mg L^{-1} y 10 mg L^{-1}) en 10 mL a partir de esta. Ambos compuestos contienen el C en distintas proporciones, por lo que fueron necesarios una serie de cálculos para llegar al mismo valor de 1000 mg L^{-1} .

Para el ácido cítrico empleado o $\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_7$, la masa molecular fue de $210,14 \text{ g mol}^{-1}$.

Una concentración de 1000 mg L^{-1} en 50 mL se consigue con 50 mg de C:

$$1000 \text{ mg L}^{-1} \text{ C} \times 50 \times 10^{-3} \text{ L} = 50 \text{ mg C}$$

La masa molecular del C es de 12 g mol^{-1} , por lo que 50 mg equivaldrían a $4,16 \times 10^{-3}$ moles de C:

$$50 \text{ mg C} / 12 \text{ g} \times 10^3 \text{ mg} \times 1 \text{ mol} / 12 \text{ g} = 4,16 \times 10^{-3} \text{ moles de C}$$

Cada mol de $\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_7$ contiene 6 moles de C, por lo que la relación es de 1/6:

$$4,16 \times 10^{-3} \text{ mol C} \times 1 \text{ mol } \text{C}_6\text{H}_8\text{O}_7 / 6 \text{ mol C} = 6,94 \times 10^{-4} \text{ mol } \text{C}_6\text{H}_8\text{O}_7$$

Ahora que se conocen los moles necesarios del compuesto, es posible calcular cuánto pesar en la balanza:

$$6,94 \times 10^{-4} \text{ mol C}_6\text{H}_8\text{O}_7 \times 210,14 \text{ g C}_6\text{H}_8\text{O}_7 / 1 \text{ mol C}_6\text{H}_8\text{O}_7 = \mathbf{0,145 \text{ g C}_6\text{H}_8\text{O}_7}$$

Mediante la fórmula $C_i \times V_i = C_f \times V_f$ es posible conocer en qué proporción, la solución de 1000 mg L⁻¹ y el agua ultrapura permiten crear el resto de las diluciones:

$$1000 \text{ mg L}^{-1} \times V_i = 200 \text{ mg L}^{-1} \times 10 \text{ mL} \rightarrow V_i = 2 \text{ mL}$$

$$1000 \text{ mg L}^{-1} \times V_i = 100 \text{ mg L}^{-1} \times 10 \text{ mL} \rightarrow V_i = 1 \text{ mL}$$

$$1000 \text{ mg L}^{-1} \times V_i = 50 \text{ mg L}^{-1} \times 10 \text{ mL} \rightarrow V_i = 0,5 \text{ mL}$$

$$1000 \text{ mg L}^{-1} \times V_i = 10 \text{ mg L}^{-1} \times 10 \text{ mL} \rightarrow V_i = 0,1 \text{ mL}$$

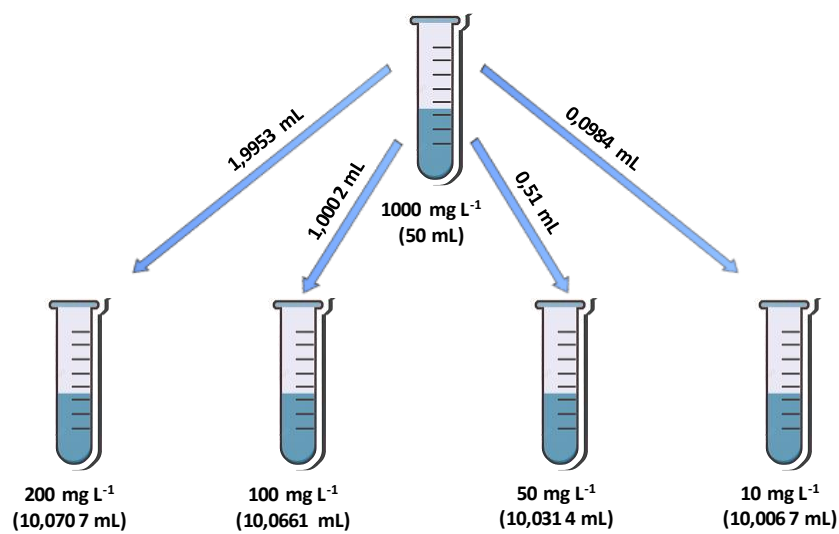


Figura 2. Diluciones de 200, 100, 50 y 10 mg L⁻¹ preparadas con ácido cítrico.

La preparación de las distintas diluciones se realizó gravimétricamente y los resultados obtenidos para cada concentración fueron los siguientes:

cps	µg L ⁻¹	cuentas (en 100 µs)	mg L ⁻¹
21424,0188	0	2,14240188	0
38292,9256	10000	3,82929256	10000
115251,614	50000	11,5251614	50000
201967,555	100000	20,1967555	100000
378156,233	200000	37,8156233	200000

Al representar en un gráfico de dispersión, la intensidad en cuentas por segundo (cps) en el eje Y, y la concentración ($\mu\text{g L}^{-1}$) en el eje X, podemos obtener una curva de calibrado donde interpolar las muestras para conocer la concentración de carbono en las mismas. La pendiente representa la sensibilidad de la técnica y es de un valor de **1,784 cps μg^{-1} L**.

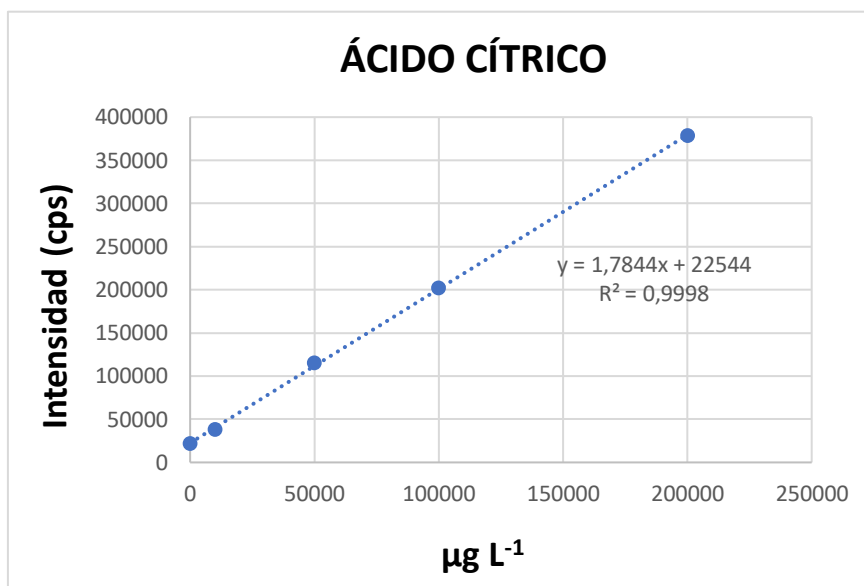


Figura 3. Intensidad (cps) representada frente a la concentración de ácido cítrico ($\mu\text{g L}^{-1}$).

Para el ácido tartárico empleado o $\text{C}_4\text{H}_6\text{O}_6$, la masa molecular es de $150,087 \text{ g mol}^{-1}$.

Una concentración de 1000 mg L^{-1} en 50 mL se consigue con 50 mg de C:

$$1000 \text{ mg C/L} \times 50 \times 10^{-3} \text{ L} = 50 \text{ mg C}$$

La masa molecular del C es de 12 g mol^{-1} , por lo que 50 mg equivaldrían a $4,16 \times 10^{-3}$ moles de C:

$$50 \text{ mg C} / 12 \text{ g} \times 10^3 \text{ mg} \times 1 \text{ mol} / 12 \text{ g} = 4,16 \times 10^{-3} \text{ moles de C}$$

Cada mol de $\text{C}_4\text{H}_6\text{O}_6$ contiene 4 moles de C, por lo que la relación es de 1/4:

$$4,16 \times 10^{-3} \text{ mol C} \times 1 \text{ mol } \text{C}_4\text{H}_6\text{O}_6 / 4 \text{ mol C} = 1,04 \times 10^{-3} \text{ mol } \text{C}_4\text{H}_6\text{O}_6$$

Ahora que se conocen los moles necesarios del compuesto, es posible calcular cuánto pesar en la báscula:

$$1,04 \times 10^{-3} \text{ mol } \text{C}_4\text{H}_6\text{O}_6 \times 150,087 \text{ g } \text{C}_4\text{H}_6\text{O}_6 / 1 \text{ mol } \text{C}_4\text{H}_6\text{O}_6 = \mathbf{0,156 \text{ g } \text{C}_4\text{H}_6\text{O}_6}$$

Mediante la fórmula $C_i \times V_i = C_f \times V_f$ es posible conocer en qué proporción, la solución de 1000 mg L^{-1} y el agua ultrapura permiten crear el resto de las diluciones:

$$1000 \text{ mg L}^{-1} \times V_i = 200 \text{ mg L}^{-1} \times 10 \text{ mL} \rightarrow V_i = 2 \text{ mL}$$

$$1000 \text{ mg L}^{-1} \times V_i = 100 \text{ mg L}^{-1} \times 10 \text{ mL} \rightarrow V_i = 1 \text{ mL}$$

$$1000 \text{ mg L}^{-1} \times V_i = 50 \text{ mg L}^{-1} \times 10 \text{ mL} \rightarrow V_i = 0,5 \text{ mL}$$

$$1000 \text{ mg L}^{-1} \times V_i = 10 \text{ mg L}^{-1} \times 10 \text{ mL} \rightarrow V_i = 0,1 \text{ mL}$$

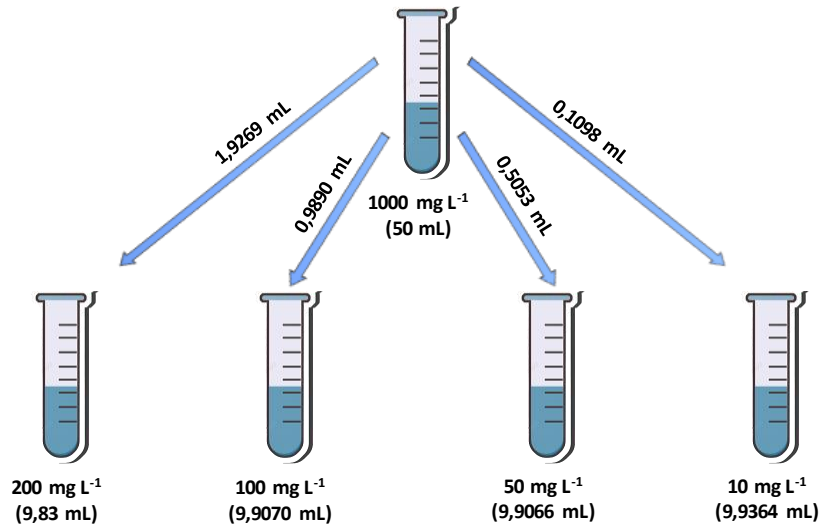


Figura 4. Diluciones de 200, 100, 50 y 10 mg L⁻¹ preparadas con ácido tartárico.

Los resultados obtenidos para cada concentración fueron los siguientes:

Cuentas (en 100 μs)	μg L ⁻¹
2,16212188	0
3,96044929	10
11,8928486	50
20,7333051	100
38,2772267	200

cps	μg L ⁻¹
21621,2188	0
39604,4929	10000
118928,486	50000
207333,051	100000
382772,267	200000

La pendiente representa la sensibilidad de la técnica y es de un valor de **1,806**.

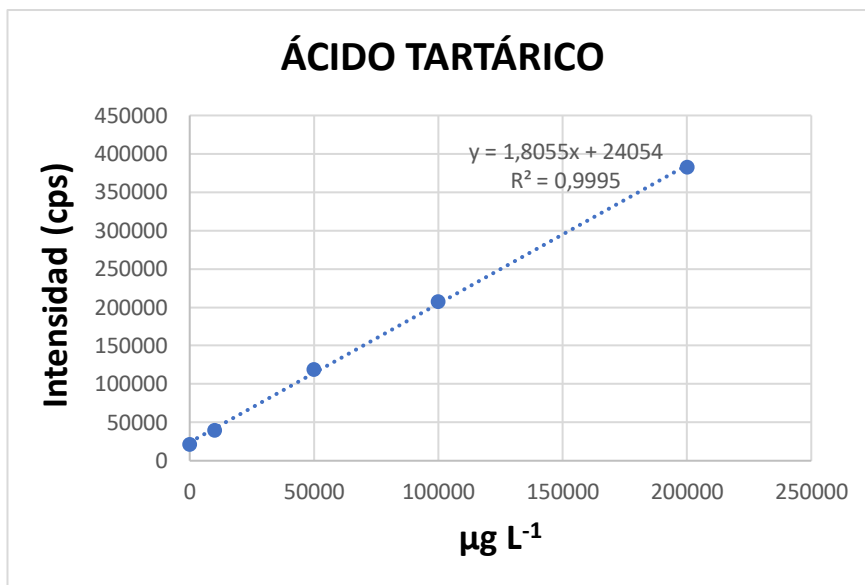


Figura 5. Intensidad (cps) representada frente a la concentración de ácido tartárico (µg L⁻¹).

Las pendientes obtenidas con ambos compuestos son prácticamente idénticas, pues teniendo en cuenta que el elemento relevante para formarlas es el carbono, no deberían diferenciarse si las mediciones se han realizado con precisión, así que podemos utilizar cualquiera de los dos compuestos para calibrar.

CÁLCULO DE LA EFICIENCIA DE TRANSPORTE

La eficiencia de transporte (η_n) se define como la cantidad de analito que pasa al plasma en relación con la cantidad de analito aspirada, puesto que, en la cámara de nebulización, las partículas de mayor tamaño se acaban descartando por gravedad, por lo que es necesario tener en cuenta esta pérdida de volumen. Cuando se emplea el instrumento para medir una disolución iónica, no se conocen realmente cuanta cantidad de carbono llega al plasma debido a esta discriminación por tamaño de gota, pero la eficiencia de transporte permite corregir el calibrado iónico para obtener una aproximación más precisa.

Si un metal alcanza el plasma en forma de una sola nanopartícula, su masa determinará el tamaño de la partícula y no se verá afectada por el volumen de solución que la acompaña; en cambio, cuando se trata de un metal disuelto, la masa total que llegue al plasma dependerá de la concentración del metal y el volumen de solución que recorra la cámara hasta el plasma durante un determinado tiempo de permanencia o “dwell time” (t_d) (Pace y col., 2011). Esta eficiencia de transporte puede calcularse utilizando diferentes métodos como son el “waste collection method” o método de recogida de residuos, el “particle frequency method” o método

de frecuencia de partícula, el “particle size method” o método de tamaño de partícula y el “dynamic mass flow method” o método de flujo másico dinámico. En este caso hemos optado por utilizar el método basado en el tamaño de partícula o “particle size method”. En este caso, la η_n se calcula como el porcentaje que supone la pendiente de una recta de calibrado elaborada con un metal disuelto respecto a la pendiente de una recta elaborada empleando nanopartículas de ese metal. En este caso, se asume que las nanopartículas, debido a su pequeño tamaño se comportan igual que el compuesto iónico. El oro (Au) es el analito elegido para realizar este cálculo, ya que se dispone de nanopartículas de referencia estables de este metal.

$$\eta_n = \frac{R_{\text{ionic}}}{R_{\text{NP}}} \times 100 \%$$

Ecuación 1. Fórmula para el cálculo de la eficiencia de transporte (η_n).

Tabla 1. Intensidad (cuentas) en función de la masa para el calibrado de Au iónico y Au en forma de nanopartícula.

masa (μg)	cuentas
0	0,038737
8,92E-10	0,466792
1,78E-09	1,076045

masa (μg)	cuentas
0	0,000657
1,26E-09	14,52818

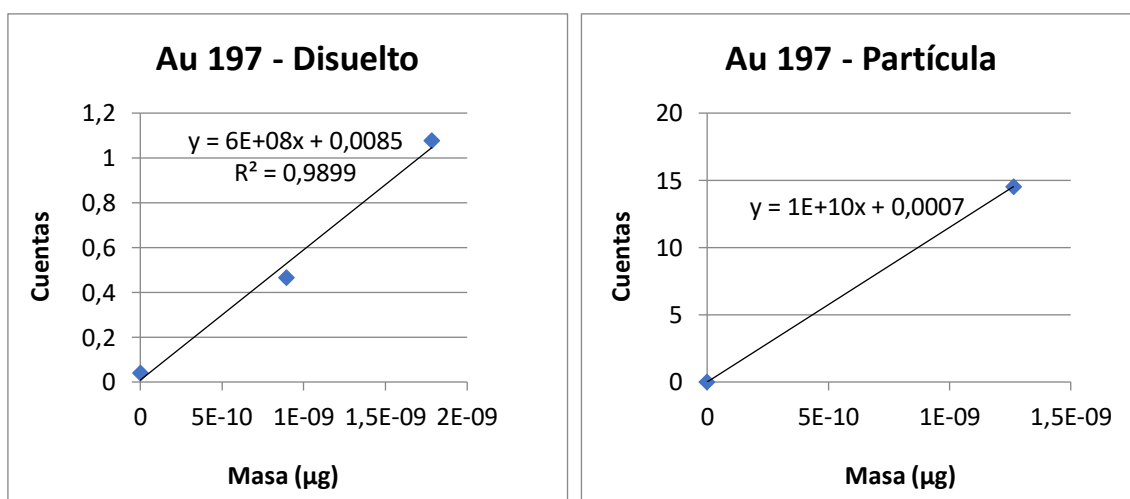


Figura 6. Rectas de calibración elaboradas con Au en disolución (iónico) y Au en forma de nanopartícula. Intensidad (cuentas) representada frente a masa (μg).

Teniendo en cuenta los valores de las pendientes anteriores y aplicando la ecuación 1, podemos calcular el valor de eficiencia de transporte:

$$\eta_n = (581668224,3/11501254332,3554) \times 100 = \mathbf{5,057 \%}$$

DETERMINACIÓN DEL TAMAÑO DE PARTÍCULA

Conociendo la eficiencia de transporte, se puede establecer una relación entre la concentración del patrón de metal y el flujo de masa total, transformando la curva de calibración del metal disuelto de intensidad representada frente a concentración a intensidad frente a masa observada por evento, extrapolando de esta forma la masa de las partículas a partir de la intensidad del pulso (*Pace y col., 2011*).

$$m_p = \frac{I_p \times t_d}{RF_{ion}} \times \frac{V \times \eta_n}{60} \times \frac{M_p}{M_a}$$

Ecuación 2. Fórmula para el cálculo de la masa de las partículas.

Donde:

I_p = es la intensidad integrada de cada partícula individual detectada (cps)

RF_{ion} = es la pendiente del calibrado iónico, empleamos el cítrico [$\text{cps } \mu\text{g}^{-1} \text{L}$]

t_d = es el tiempo de permanencia (s)

V = es el caudal de la muestra (mL min^{-1})

η_n = es la eficiencia de transporte

M_p = es la masa molar del material de nanopartículas, poliestireno en nuestro caso $[(\text{C}_8\text{H}_8)_n]$ (g mol^{-1})

M_a = es la masa molar del analito medido en el material, carbono en nuestro caso $[\text{C}_8]$ (g mol^{-1})

Los valores para cada parámetro se muestran a continuación:

I_p = intensidad integrada de cada partícula individual detectada (cps)

$RF_{ion} = 1,784 \text{ cps } \mu\text{g}^{-1} \text{L}$

$t_d = 0,0001 \text{ s}$

$$V = 0,535 \text{ mLmin}^{-1}$$

$$M_p = 104 \text{ gmol}^{-1}$$

$$M_a = 96 \text{ gmol}^{-1}$$

Una vez se conoce la masa de las partículas, es posible, asumiendo que posean una forma esférica, determinar su diámetro (diámetro equivalente esférico). Para ello se necesita la densidad (ρ_p) del material plástico, el poliestireno en este caso.

$$\rho_p = 1,05 \text{ g ml}^{-1}$$

$$d_p = 3 \sqrt{\frac{6 m_p}{\pi \rho_p}} \times 10^4$$

Ecuación 3. Fórmula para el cálculo del diámetro (diámetro equivalente esférico) de las partículas (nm).

Si se dispone de estándares de partículas del material, también puede realizarse la calibración mediante la medición de partículas de diferentes tamaños. En este caso, los cálculos son mucho más sencillos, ya que simplemente se tiene que interpolar en dicha la curva de calibrado la intensidad observada para la muestra desconocida. A pesar de ser una calibración mucho más sencilla que la anterior, el mayor problema es que no se dispone de estándares de partículas certificados de diferentes tamaños para todos los materiales existentes. Además, requiere la identificación del tipo de plástico de la muestra desconocida para poder realizar la calibración con los estándares adecuados. En este estudio, se realizaron varias medidas con microplásticos de poliestireno de tamaños conocidos (1 μm , 2 μm , 3 μm , 4 μm , 5 μm y 6 μm). Para cada tamaño se obtiene un gráfico de donde se representa el número de partículas detectadas (frecuencia) para cada intensidad (parámetro que se relaciona con el tamaño de las partículas mediante las ecuaciones presentadas anteriormente).

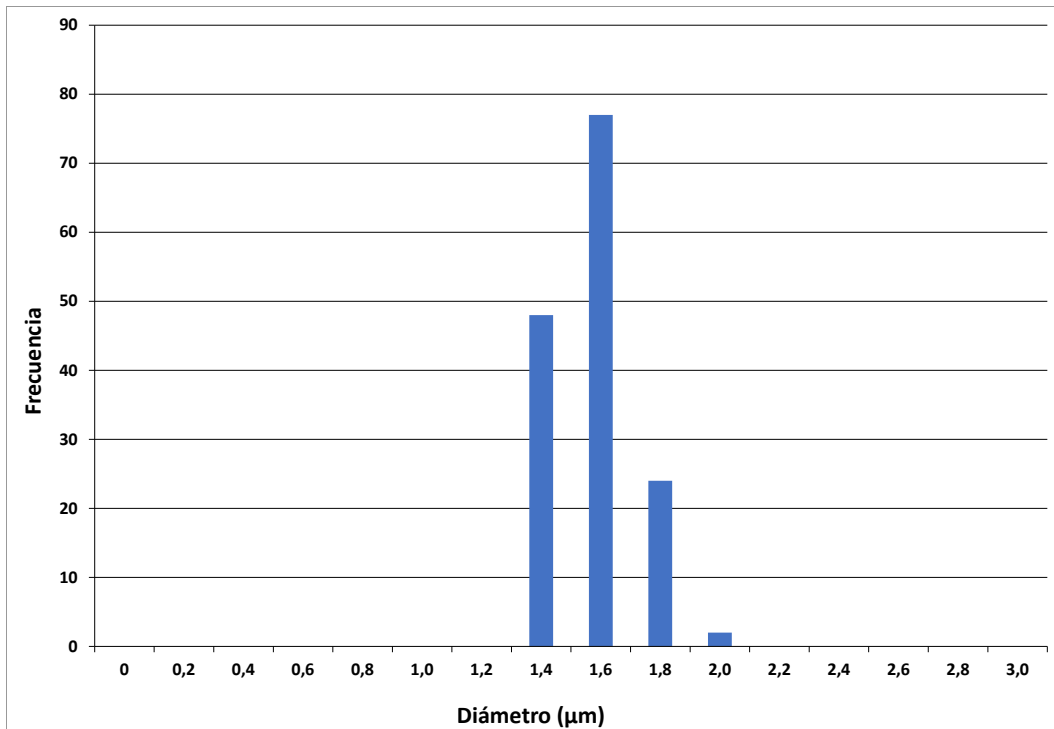


Figura 7. Diámetro de partícula calculado a partir de la intensidad integrada para 1 μm , frecuencia frente a diámetro (μm).

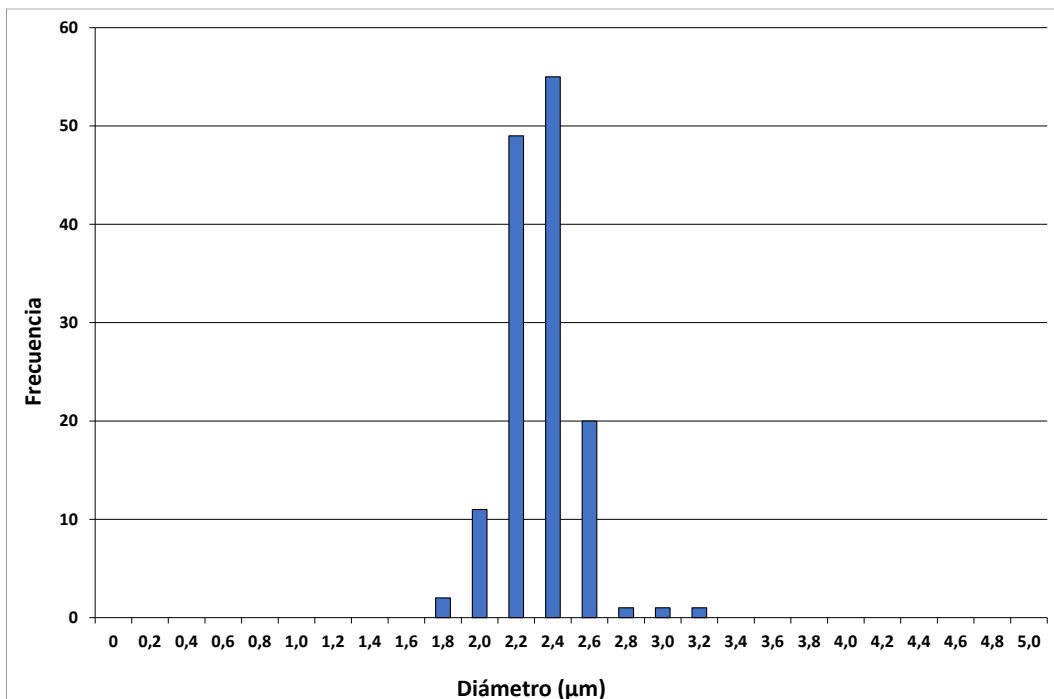


Figura 8. Diámetro de partícula calculado a partir de la intensidad integrada para 2 μm , frecuencia frente a diámetro (μm).

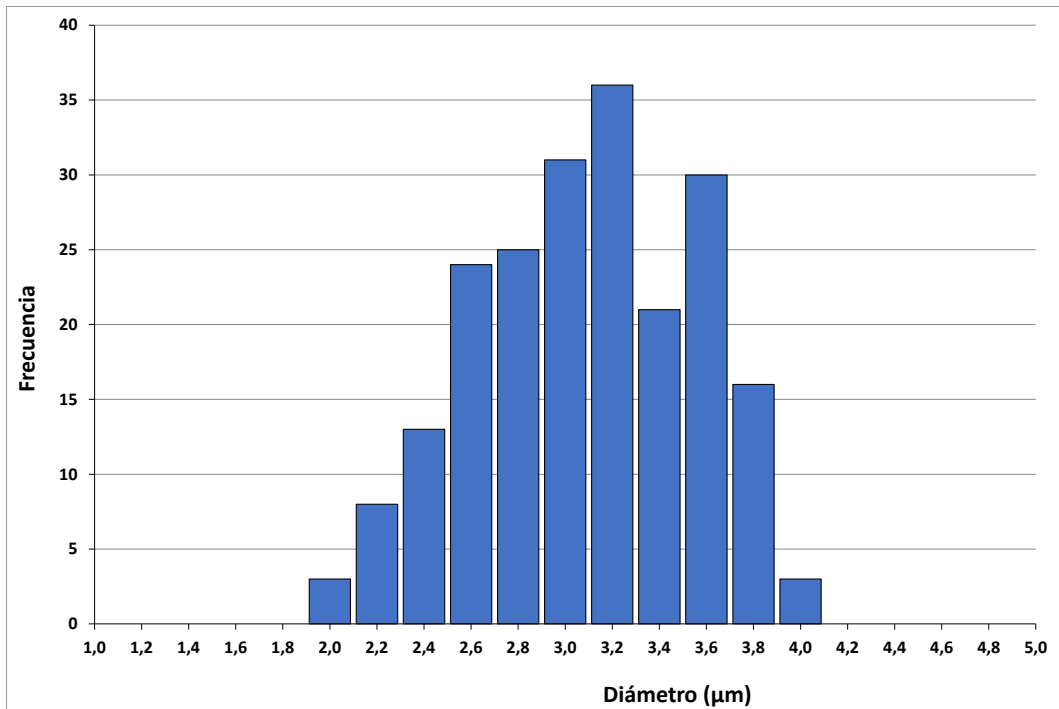


Figura 9. Diámetro de partícula calculado a partir de la intensidad integrada para 3 µm, frecuencia frente a diámetro (µm).

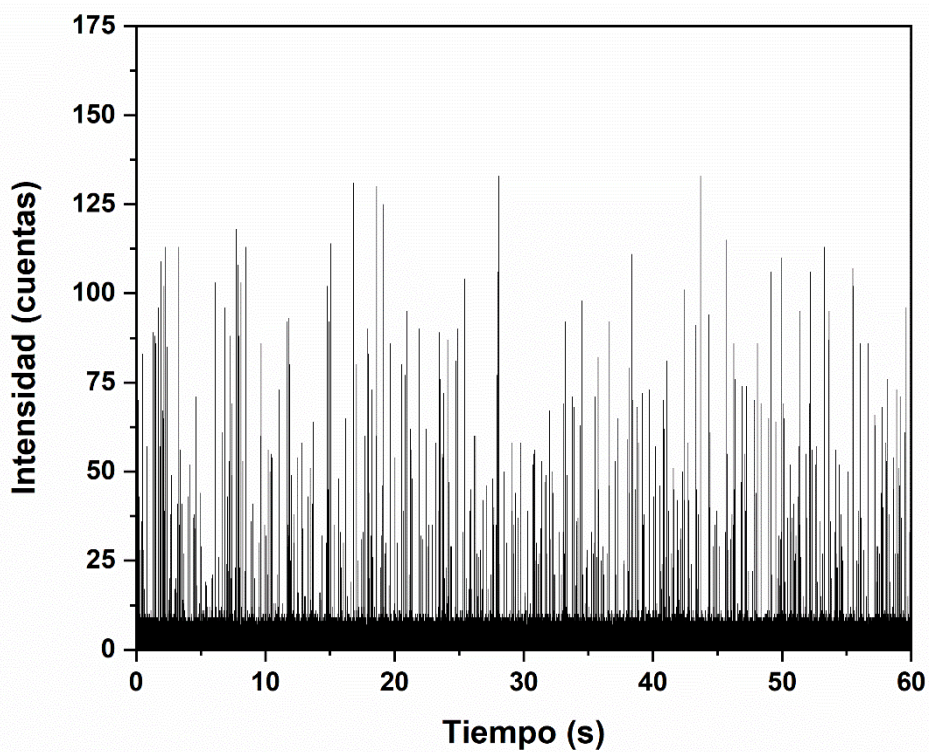


Figura 10. Raw data (información que muestra originalmente el equipo) para la suspensión de partículas de PS de 4 µm. Intensidad frente a tiempo.

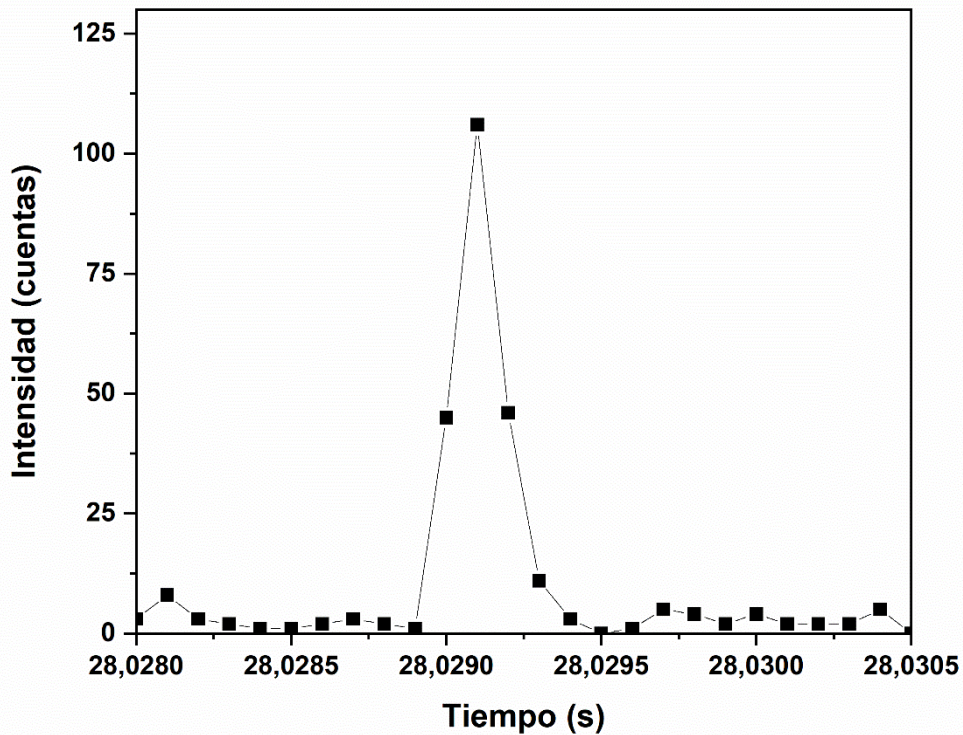


Figura 11. Ampliación de imagen del Raw data para la suspensión de partículas de PS de 4 µm (Figura 10). Se distingue un pico generado por la detección de un microplástico.

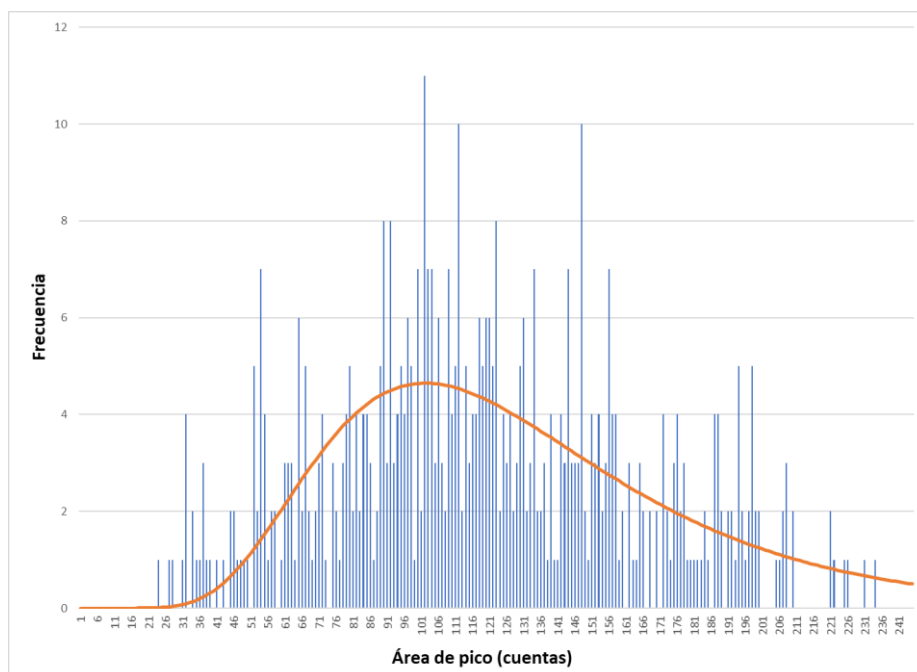


Figura 12. Frecuencia frente al área de pico (intensidad, cuentas) para la suspensión de partículas de PS de 4 µm.

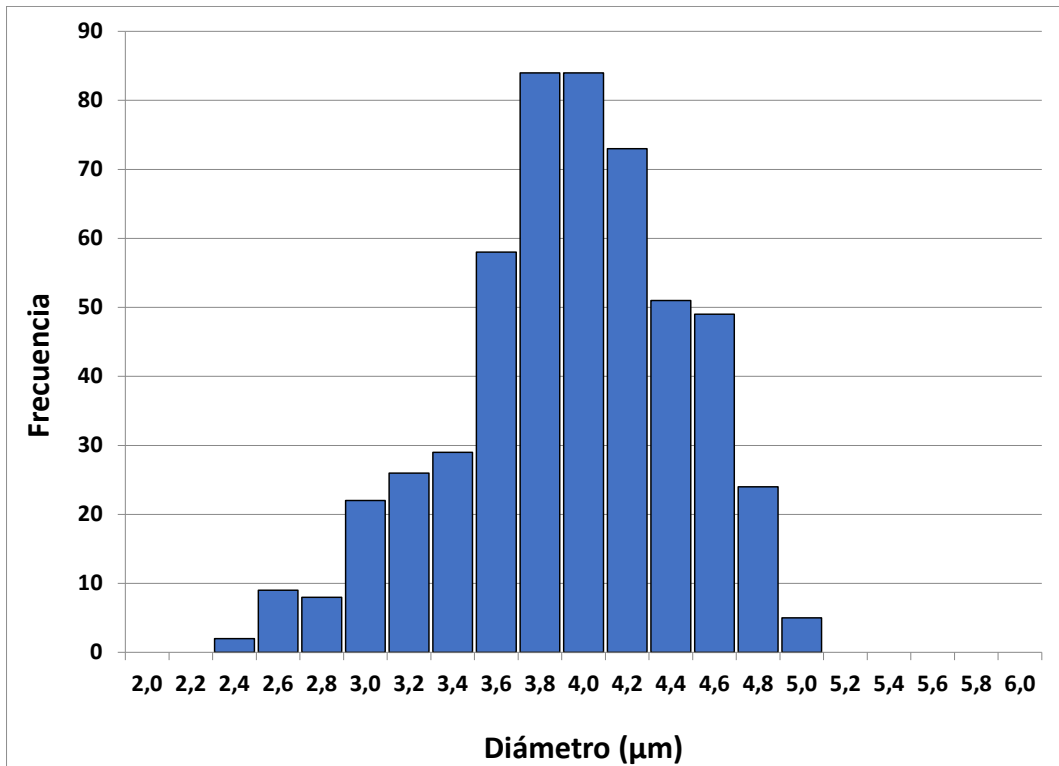


Figura 13. Diámetro de partícula calculado a partir de la intensidad integrada para 4 μm, frecuencia frente a diámetro (μm).

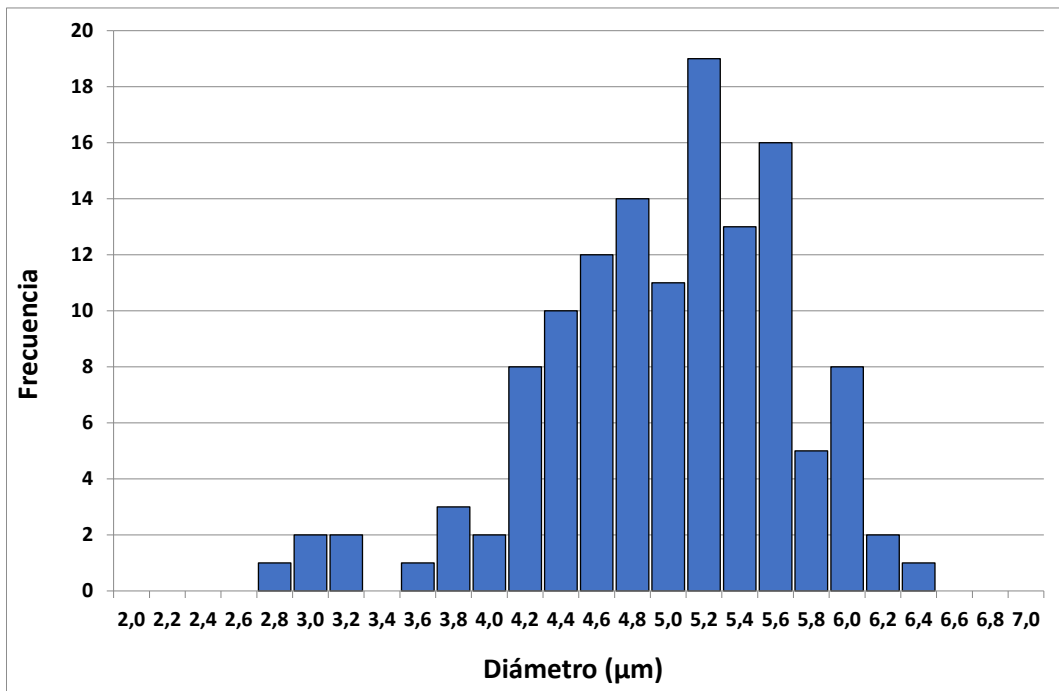


Figura 14. Diámetro de partícula calculado a partir de la intensidad integrada para 5 μm, frecuencia frente a diámetro (μm).

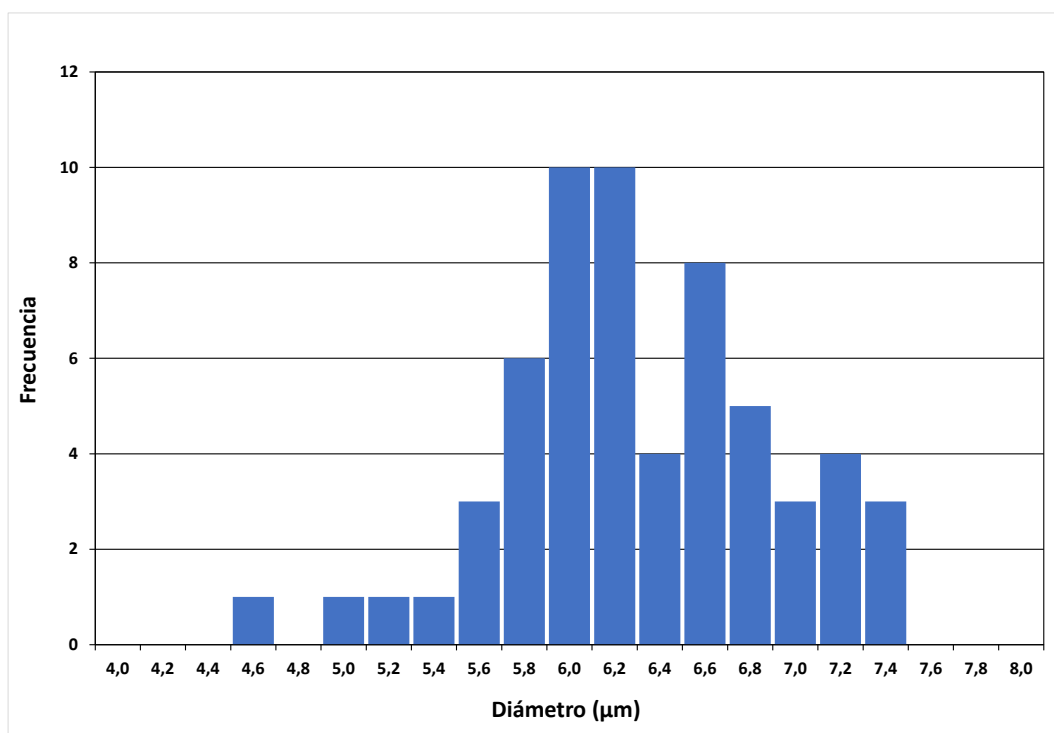


Figura 15. Diámetro de partícula calculado a partir de la intensidad integrada para 6 µm, frecuencia frente a diámetro (µm).

En las figuras 7, 8, 9, 13, 14 y 15, se ha representado la distribución de tamaño calculada para los distintos microplásticos de PS a través de las ecuaciones 2 y 3. Como puede observarse, los valores obtenidos son similares a los certificados por el fabricante (ver Tabla 2), por lo que se puede concluir que el método desarrollado para la caracterización de microplásticos es fiable.

Tabla 2. Comparación entre los tamaños certificados por el fabricante y los obtenidos mediante el uso de SP-ICP-MS para los microplásticos de PS comerciales para la intensidad integrada máxima (mayor frecuencia)

	1 µm	2 µm	3 µm	4 µm	5 µm	6 µm
Valor certificado (µm)	1,04	2,07	3,10	3,97	5,19	6,05
Valor experimental (µm)	1,36	2,20	3,14	3,82	5,05	6,02

Es importante remarcar, que conforme aumenta el tamaño de partícula, las distribuciones van siendo menos claras, ya que el número de microplásticos detectados es menor. Esto sucede porque el incremento del tamaño de los microplásticos provoca una discriminación cada vez mayor de los mismos en el proceso de entrada por la cámara de nebulización, disminuyendo de esta forma la eficiencia de transporte. Para mejorar las distribuciones y ofrecer una visión más clara de las mismas, se han aglutinado los resultados de diámetro y frecuencia en grupos. Si se deseara evitar este inconveniente, debería emplearse un sistema de introducción más eficiente, que discriminase menos los tamaños más grandes (lo que se llama sistemas de introducción de alta eficiencia o de consumo total) o aumentar el tiempo de medida (para obtener más eventos y mejorar así la estadística).

Tal y como se mencionó anteriormente, otra forma de realizar la calibración es mediante una calibración directa de estándares de microplásticos. La curva de calibración que se muestra a continuación ha sido realizada con los estándares de PS comerciales disponibles y es una relación lineal (coeficiente de regresión de 0,997) entre la intensidad de cada estándar con el volumen de partícula. Esto demuestra que es posible caracterizar los microplásticos obteniendo su tamaño empleando un calibrado con partículas de poliestireno.

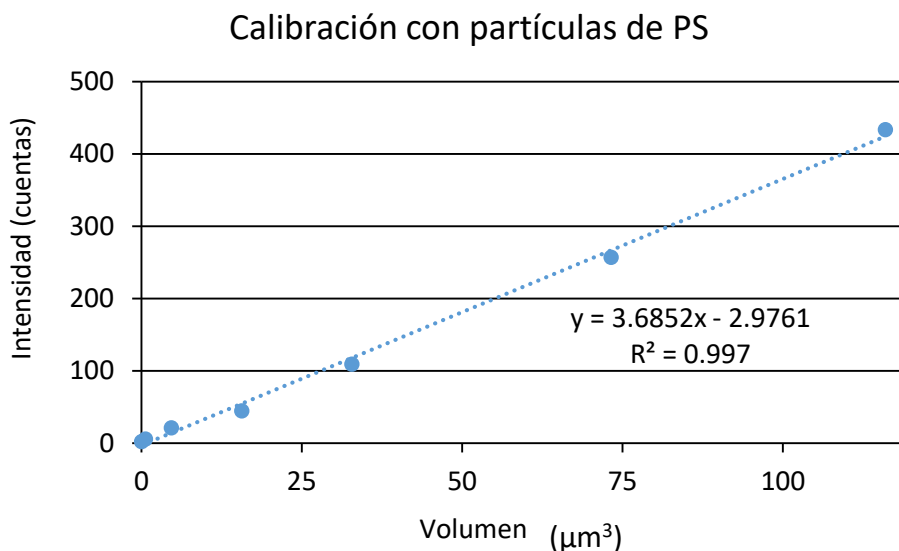


Figura 16. Curva de calibrado elaborada con partículas de poliestireno de diferentes tamaños. Intensidad (cuentas) representada frente al volumen (μg^3).

ENSAYO CON MUESTRAS REALES

Una vez se tiene noción de los microplásticos detectados en muestras conocidas, el siguiente paso es la búsqueda de estas partículas en modelos reales. En este caso, se han estudiado envases plásticos que contengan alimentos, preferiblemente aquellos que deban ser sometidos a un tratamiento térmico, pues la aplicación de temperatura supone una degradación del plástico del envase (Zangmeister y col., 2022). En este trabajo, el ensayo se llevó a cabo con envases para fideos instantáneos y arroz cocido de preparación en microondas. Ambos envases son de polipropileno. En el primero, el calentamiento es realizado a través de la adición de agua hirviendo por tres minutos, mientras que, en el caso del arroz, el envase se calienta en el microondas por un minuto. Se reprodujeron estos sistemas de preparación sustituyendo el producto alimenticio por agua ultrapura. En ambos casos, tras eliminar el contenido de los envases, éstos se lavaron rigurosamente con agua ultrapura varias veces para eliminar todo el producto (incluso las partículas más pequeñas) antes de reproducir el proceso de preparación establecido por los fabricantes, ya que introducir un compuesto orgánico al ICP, como es el caso de la matriz alimentaria, aumentaría considerablemente el *background* debido a su alto contenido en carbono, limitando la capacidad de detección para los microplásticos.

En primer lugar, se midió una disolución de 2 μm de PS que había sido empleada anteriormente para obtener la curva de calibrado para partículas de poliestireno, pues la sensibilidad del instrumento varía a lo largo de los días y es necesario recalcular un punto de la recta de calibrado para extrapolarlo a la que se obtuvo con la medición de los estándares antes de realizar las medidas. La intensidad media que se consiguió el primer día con el estándar de 2 μm fue de **22,89**, mientras que el día de los ensayos con muestras reales fue de **36,13**; la relación entre ambos valores es de **1,5784**, por lo que este valor es el que se atribuye al cambio de sensibilidad del equipo entre los diferentes días y deberá tenerse en cuenta a la hora de obtener los resultados finales.

Una vez realizada la calibración con el blanco y medidas las muestras, los resultados obtenidos indicaron que, en el caso del envase de los fideos, no se observó la presencia de micropartículas, mientras que, en el envase del arroz, se distingue claramente su presencia.

Si se observan los valores de intensidad de fondo de la muestra del envase de los fideos, en ninguna de las tres mediciones efectuadas se produce un cambio de intensidad con respecto al obtenido con la medida del blanco, por lo que es posible concluir que no hay ningún elemento disuelto en el agua que produzca una señal en el instrumento.

En cuanto a la muestra del envase de arroz, tal y como se mencionó anteriormente, se distingue una clara presencia de microplásticos, ya que podemos ver una distribución clara. En la Figura 17 se muestra un ejemplo de una de las réplicas medidas. Las medidas se llevaron a cabo por triplicado y los resultados obtenidos indican una clara consistencia entre las tres réplicas en cuanto al número de picos y la intensidad media confirmado así la reproducibilidad del ensayo.

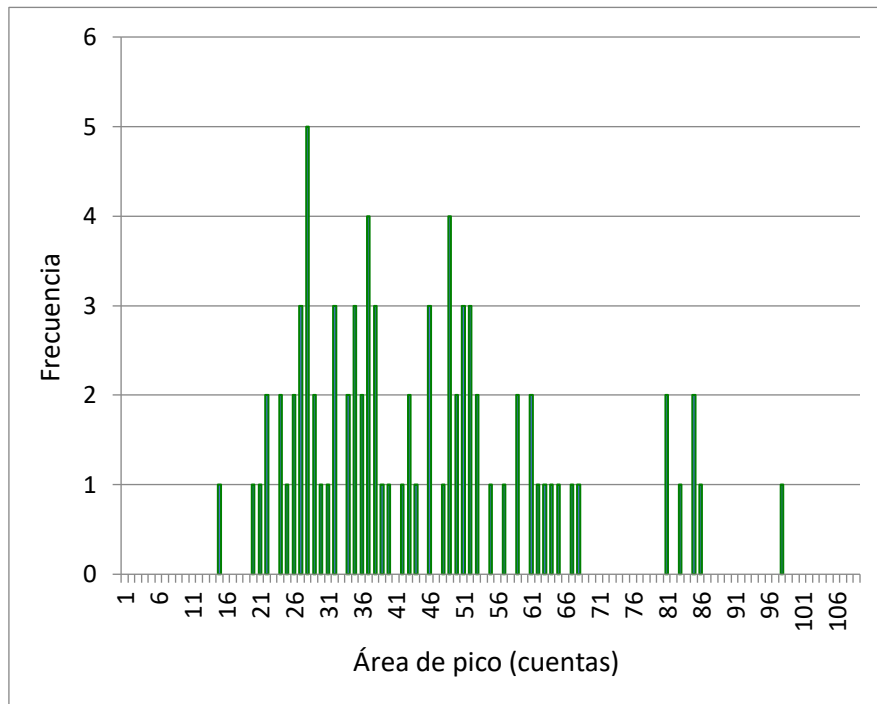


Figura 17. Intensidad máxima obtenida con el envase de arroz, frecuencia frente al área de pico (cuentas).

Tabla 3. Resultados obtenidos del nº de picos e intensidad media (cuentas) corregida de las medidas efectuadas con el envase de arroz.

	Réplica 1	Réplica 2	Réplica 3
nº picos	43	48	32
Intensidad media (cuentas)	30,26	27,83	29,49

Una vez obtenidos los resultados de microplásticos para la muestra del envase de arroz y corregidos por el factor de sensibilidad, debemos realizar la interpolación en una curva de calibrado para obtener el tamaño de los microplásticos observados. Al tratarse de un tipo de polímero diferente al que utilizamos para realizar la curva de calibrado (polipropileno en lugar

de poliestireno), es necesario realizar una conversión de la pendiente obtenida para PS para poder obtener los resultados de PP. Para ello, hay que tener en cuenta tanto la proporción de carbono como la densidad de ambos polímeros.

Contenido de carbono en el PS: 92,31 %

Densidad PS: 1,05 g cm⁻³

Contenido de carbono en el PP: 85,71 %

Densidad PP: 0,9 g cm⁻³

Relación pendiente polímeros = $(0,9231 \times 1,05) / (0,8571 \times 0,9) = 1,26$

Con estos datos podemos calcular que la relación entre las pendientes de las curvas de calibrado de los dos tipos de polímeros (PS/PP) es de 1,26. Teniendo en cuenta esta relación, la pendiente de la recta de polipropileno corresponde a 2,9248 (pendiente PS/1,26). Con esta pendiente podemos calcular el volumen de las partículas de PP observadas en la muestra y finalmente también su tamaño. En la Tabla 4 pueden verse los resultados de diámetro medio calculados para las tres réplicas de medida, y en la Figura 18, se presenta la distribución de tamaños de las partículas de PP detectadas en el envase de arroz teniendo en cuenta las tres réplicas de medida.

Tabla 4. Resultados obtenidos para las tres réplicas de medida del contenido de microplásticos extraídos del envase de arroz.

	Intensidad media corregida (cuentas)	Volumen medio (μm^3)	Diámetro medio (μm)
Medida 1	30,26	9,328	2,612
Medida 2	27,83	8,498	2,532
Medida 2	29,49	9,065	2,587

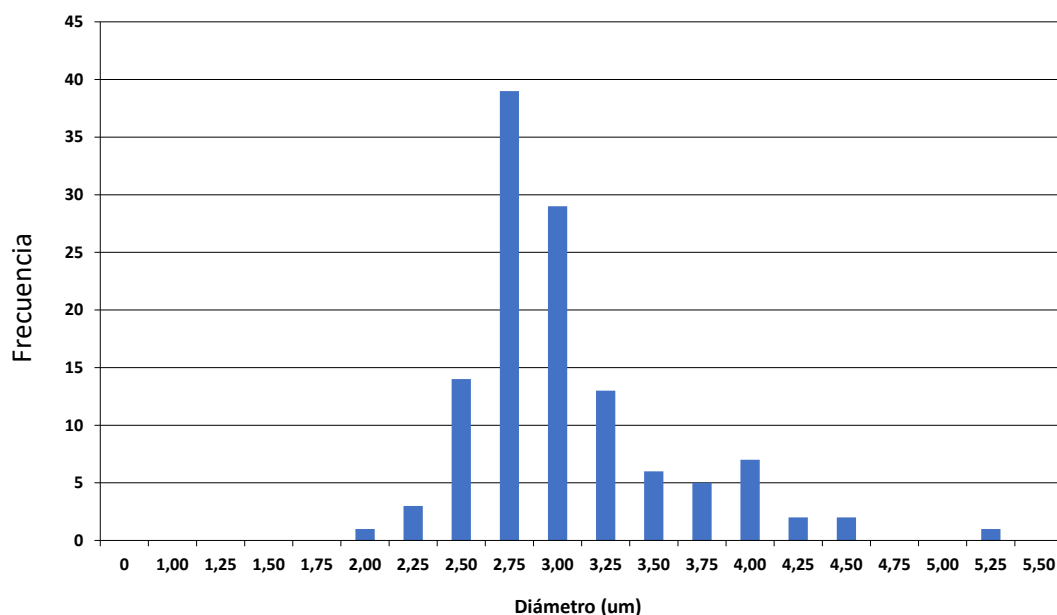


Figura 18. Distribución de tamaño de los microplásticos de PP extraídos del envase de arroz. Se han utilizado los datos de las tres réplicas de medida.

CONCLUSIÓN

La deriva logística de la industria alimentaria en la era moderna ha trazado un puente entre los micro y nanoplásticos y los organismos, lo que, atendiendo a la evidencia científica, podría originar un impacto negativo en la salud, alterando la microbiota gastrointestinal y las funciones celulares.

El ICP-MS, gracias a su capacidad para medir las partículas más pequeñas se ha presentado como una posible vía para la estandarización de los procesos de caracterización de microplásticos. La información que aporta este instrumento sobre los microplásticos permitiría establecer una relación entre el tamaño y número de partículas y los efectos tóxicos generados por éstas, haciendo posible calcular valores habitualmente empleados en materia de seguridad alimentaria como la ingesta diaria admisible (IDA), pudiendo de esta forma en un futuro, llegar a confeccionar mecanismos legales para su control.

Es necesario seguir investigando tanto en los efectos potencialmente adversos de los microplásticos en los organismos como en la optimización del ICP-MS y otros instrumentos de medida para su caracterización, de esta forma se logrará finalmente proteger al consumidor de estas partículas.

CONCLUSION

The logistical drift of the food industry in the modern era has drawn a bridge between micro and nanoplastics and organisms, which, then to scientific evidence, could cause a negative impact on health, altering the gastrointestinal microbiota and cellular functions.

ICP-MS, thanks to its ability to measure the smallest particles, has been presented as a possible way for the standardization of microplastic characterization processes. The information provided by this instrument on microplastics would allow to establish a relationship between the size and number of particles and the toxic effects generated by them, making it possible to calculate values commonly used in food safety such as the acceptable daily intake (ADI), being able to In this way, in the future, to create legal mechanisms for its control.

It is necessary to continue researching both the potentially adverse effects of microplastics on organisms and the optimization of ICP-MS and other measurement instruments for their characterization, in this way it will finally be possible to protect the consumer from these particles.

VALORACIÓN PERSONAL

La realización de esta asignatura ha sido sin lugar a dudas una experiencia enriquecedora que, en mi caso, me ha llevado a exprimir al máximo todas las herramientas adquiridas durante el grado universitario.

Por primera vez las exigencias se acercan a la excelencia, pues el trabajo está supervisado más que nunca por catedráticos, doctores e investigadores, que no pueden permitirse un descuido a la hora de dar el visto bueno a sus publicaciones. Gracias a esto el alumno aprende de una forma sin precedentes de los errores cometidos, percatándose de detalles, a veces más superfluos y otras más significativos, que de otra forma hubieran pasado desapercibidos, adquiriendo así una capacidad de observación y de amplitud de miras que eleva cuantiosamente el techo de lo que hasta ahora creíamos posible hacer por nosotros mismos.

BIBLIOGRAFÍA

Aesan (2021). Microplásticos y Nanoplásticos. Disponible en: https://www.aesan.gob.es/AECOSAN/web/seguridad_alimentaria/ampliacion/microplasticos_nanoplasticos.htm#:~:text=Actualmente%20no%20existe%20ninguna%20legislaci%C3%B3n,co mo%20contaminantes%20en%20los%20alimentos.

Bolea-Fernandez, E., Rua-Ibarz, A., Velimirovic, M., Tirez, K. and Vanhaecke, F. (2020). "Detection of microplastics using inductively coupled plasma-mass spectrometry (ICP-MS)

operated in single-event mode". *J. Anal. At. Spectrom.*, 35, 455–460. Disponible en: <https://pubs.rsc.org/en/content/articlelanding/2020/ja/c9ja00379g>

Bollaín, Pastor, C. y Vicente, Agulló, D. (2019). "Presencia de microplásticos en aguas y su potencial impacto en la salud pública". *Revista Española de Salud Pública*, 93. Disponible en: https://scielo.isciii.es/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1135-57272019000100012

Degueldre, C. and Favarger, P., Y. (2003). "Colloid analysis by single particle inductively coupled plasma-mass spectroscopy: a feasibility study". *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 217(1-3), pp. 137-142. Disponible en: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S092777570200568X>

Ghosh, S., y Saha, P. D. (2017). "Use of plastics in food packaging and its impact on health". *Journal of Chemical and Pharmaceutical Sciences*, 10(4), pp. 2652-2656.

<https://reader.elsevier.com/reader/sd/pii/S0048969722019179?token=44025DD2491B850693AD7DA8C369267A29833504C3DA6DFD924F73BB0902D9A0E2425798F8C12540CE1AA443B294634&originRegion=eu-west-1&originCreation=20230411191404>

Gonzalez de Vega, R., Goyen, S., Lockwood, T., E. and Doble, P., A. (2021). "Characterisation of microplastics and unicellular algae in seawater by targeting carbon via single particle and single cell ICP-MS". *Analytica Chimica Acta*, 1174, 338737. Disponible en: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0003267021005638>

Jiménez-Lamana, J., Marigliano, L., Allouche, J., Grassl, B., Szpunar, J. and Reynaud, S. (2020). "A Novel Strategy for the Detection and Quantification of Nanoplastics by Single Particle Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry (ICP-MS)". *Anal. Chem.*, 92(17), pp. 116644-11672. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32786493/>

Kwon, J., Kim, J., Pham, T. D., Tarafdar, A., Hong, S., Chun, S., Lee, S., Kang, D., Kim, J., Kim, S. y Jung, J. (2020). "Microplastics in Food: A Review on Analytical Methods and Challenges". *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 17(18), pp. 6710. Disponible en: <https://www.mdpi.com/1660-4601/17/18/6710>

Laborda, F., Trujillo, C. and Lobinski, R. (2021). "Analysis of microplastics in consumer products by single particle-inductively coupled plasma as spectrometry using the carbon-13 isotope". *Talanta*, 221, 121486. Disponible en: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0039914020307773>

Li, D., Shi, Y., Yang, L., Xiao, L., Kehoe, D. K., Gun'ko, Y. K., Boland, J. J. y Wang, J. J. (2020). "Microplastic release from the degradation of polypropylene feeding bottles during infant

formula preparation". *Nat Food* 1, pp. 746-754. Disponible en: <https://www.nature.com/articles/s43016-020-00171-y>

Li, J., Liu, H., y Chen, J. P. (2018). "Microplastics in freshwater systems: A review on occurrence, environmental effects, and methods for microplastics detection". *Water research*, 137, pp. 362-374. Disponible en: http://www.jlakes.org/uploadfile/news_images/hpkx/2018-05-11/1-s2.0-S0043135417310515-un.pdf

Pace, H. E., Rogers, N. J., Jarolimek, C., Coleman, V. A., Higgins, C. P. y Ranville, J. F. (2011). "Determining Transport Efficiency for the Purpose of Counting and Sizing Nanoparticles via Single Particle Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry". *Analytical Chemistry*, 83(24), pp. 9361-9369. Disponible en: <https://pubs.acs.org/doi/pdf/10.1021/ac201952t>

Prata, J.C., da Costa, J.P., Duarte, A.C. y Rocha-Santos, T. (2019). "Methods for sampling and detection of microplastics in water and sediment: A critical review". *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 110, pp. 150-159. Disponible en: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0165993618305247>

Strungaru, S., Jijie, R., Nicoara, M., Plavan, G. y Faggio, C. (2019). "Micro- (nano) plastics in freshwater ecosystems: Abundance, toxicological impact and quantification methodology". *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 110, pp. 116-128. Disponible en: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0165993618304254>

Tamargo, A., Molinero, N., Reinoso, J.J. Alcolea-Rodriguez, V., Portela, R., Bañares, M. A., Fernández, J. F. y Moreno-Arribas, M. V. (2022). "PET microplastics affect human gut microbiota communities during simulated gastrointestinal digestion, first evidence of plausible polymer biodegradation during human digestion". *Scientific Reports*, 12, pp. 528. Disponible en: <https://doi.org/10.1038/s41598-021-04489-w>

Yalwaji, B., John-Nwagwu, H.O. y Sogbanmu, T.O. (2022). "Plastic pollution in the environment in Nigeria: A rapid systematic review of the sources, distribution, research gaps and policy needs". *Scientific African*, pp. 16. Disponible en: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S2468227622001272>

Zangmeister, C. D., Radney, J. G., Benkstein, K. D. y Kalanyan, B. (2022). "Common Single-Use Consumer Plastic Products Release Trillions of Sub-100 nm Nanoparticles per Liter into Water during Normal Use". *Environmental Science & Technology*, 56(9), pp. 5448-5455. Disponible en: <https://pubs.acs.org/doi/10.1021/acs.est.1c06768>

Zhang, S., Gao, H. y Bao, G. (2015). "Physical Principles of Nanoparticle Cellular Endocytosis". ACS Nano, 9(9), pp. 8655-8671. Disponible en: <https://pubs.acs.org/doi/full/10.1021/acsnano.5b03184>