Trabajo Fin de Grado

Interacción de disruptores endocrinos con microplásticos en el control de contaminantes emergentes del medio ambiente

Autor:

Dragos Ciomaga

Director:

Juan Carlos Vidal Ibáñez

Facultad de Ciencias / Universidad de Zaragoza

Septiembre de 2022

Tabla de contenido

Resumen **4**

Abstract **5**

Introducción **6**

Instrumentación y Reactivos **9**

Procedimientos experimentales **10**

Limpieza y pulido de los electrodos GCE-bare *10*

Caracterización del electrodo de trabajo GCE-bare mediante voltametria cíclica *10*

Cuantificación del BPA mediante voltametrías de pulso diferencial (DPV) *10*

Nanoestructuración de los electrodos de trabajo GCE-bare (GO y rGO). *10*

Preparación de los microplásticos (µPs) *11*

Estudio cinético de la interacción del BPA con los microplásticos *11*

Resultados y Discusion **13**

Caracterización voltamétrica de los electrodos de trabajo (GCE-bare) *13*

Modificación (nanoestructuración) de los electrodos CGE-bare *14*

Estudio de la interacción (adsorción) del BPA sobre microplásticos *20*

Obtención de los microplásticos y su caracterización por microscopía óptica. 21

Estudio cinético de la adsorción de BPA sobre los microplásticos 22

Conclusiones **27**

Bibliografía **28**

ANEXO **30**

Molécula de Bisfenol A *30*

Instrumentación electroquímica y electrodos empleados *30*

Voltagramas cíclicos del mediador ferrocianuro medidos al comparar electrodos GCE-bare, GCE-GO y GCE-rGO *31*

Voltagrama de pulso diferencial de BPA medidos al comparar electrodos GCE-bare, GCE-GO y GCE-rGO *33*

Curvas de calibrado del BPA con los distintos electrodos voltamétricos estudiados *36*

Instrumentación de laboratorio empleada en la obtención y procedimientos de caracterización y separación de los microplásticos *36*

Microfotografías empleadas para medir distribuciones de tamaño de µPs *37*

Abreviaturas empleadas en esta memoria *38*

Listado de Figs. empleadas en esta memoria TFG *39*

Listado de Tablas empleadas en la memoria de TFG *40*

Resumen

En este trabajo TFG se estudian experimentalmente las interacciones del bisphenol A con microplásticos (µPs) de poliestireno (PS-µPs) y poliestireno expandido (EPS-µPs), El bisfenol A (BPA) es un contaminante del medio ambiente muy importante y con una gran presencia debida a la contaminación producida por plásticos (se utiliza como monómero y aditivo en su preparación, o debido a otros usos como, por ejemplo, retardantes de la propagación del fuego). Pertenece a los llamados contaminantes disruptores endocrinos, ya que su molécula es similar a la de muchas hormonas y, por lo tanto, los receptores estrogénicos la reconocen fácilmente. Obviamente, los efectos en el medio ambiente y en los organismos vivos sometidos a esta contaminación son muy graves y preocupantes. Por otro lado, los propios plásticos constituyen un enorme problema medioambiental, dado que muchos de ellos (a pesar de su reciclaje y desecho independiente) acaban en este medio y por degradación física y química van formando partículas cada vez menores (es decir, con mayor poder de propagación y capacidad de retener otros contaminantes).

El trabajo pone a punto un método voltamétrico sensible y reproducible para la determinación voltamétrica del BPA, ensayándose la opción de la nanoestructuración de los electrodos de trabajo y su caracterización electroquímica. A continuación, se obtienen microplásticos , se caracterizan ópticamente, y se estudian sus interacciones con el BPA. Para ello se emplea la determinación voltamétrica de BPA en disolución y puesta a punto de un método de separación simple (por centrifugación) del BPA disuelto de los microplásticos en dispersión. Las medidas voltamétricas confirman la rápida adsorción del BPA por los microplásticos, permiten modelizar la interacción y nos proporciona información cinética muy útil para el estudio de esta contaminación sinérgica.

Abstract

In this TFG work, the interactions of bisphenol A with microplastics (µPs) of polystyrene (PS-µPs) and expanded polystyrene (EPS-µPs) are studied experimentally. Bisphenol A (BPA) is a very important environmental pollutant and with a great presence due to contamination caused by plastics (it is used as a monomer and additive in its preparation, or due to other uses, such as fire retardants). It belongs to the so-called endocrine disrupting pollutants, since its molecule is similar to that of many hormones and, therefore, it is easily recognized by estrogenic receptors. Obviously, the effects on the environment and living organisms subjected to this pollution are very serious and worrying. On the other hand, plastics themselves constitute a huge environmental problem, given that many of them (despite their recycling and independent disposal) end up in this environment and due to physical and chemical degradation they form increasingly smaller particles (that is, with greater spreading power and ability to retain other contaminants).

The work develops a sensitive and reproducible voltammetric method for the voltammetric determination of BPA, testing the option of nanostructuring the working electrodes and their electrochemical characterization. Next, microplastics are obtained, optically characterized, and their interactions with BPA are studied. For this purpose, the voltammetric determination of BPA in solution and the development of a simple separation method (by centrifugation) of the dissolved BPA from the microplastics in dispersion are used. Voltammetric measurements confirm the rapid adsorption of BPA by microplastics, allow modeling the interaction and provide us with very useful kinetic information for the study of this synergistic contamination.

Introducción

La producción mundial de plásticos ha crecido exponencialmente con el paso del tiempo, por ejemplo, de unas 2 millones de toneladas en 1950 hasta aproximadamente 380 millones en el año 2015 (1). Pero este aumento de la producción también conlleva un aumento de la contaminación estimándose que cada año, entre 4 y 12 millones de toneladas de plásticos acaban en los océanos (2) constituyendo un enorme problema medioambiental, ya sea por sí mismos o por interacciones que tienen con otros elementos presentes en los océanos.

El bisfenol A (BPA) es un producto químico industrial utilizado como monómero en la fabricación de plásticos de policarbonato y resinas epoxi. También tiene aplicaciones en la síntesis de poliacrilatos, poli-sulfonatos, poli-ésteres insaturados y retardantes de incendios (3). Por ejemplo, los poli-carbonatos se emplean en una amplia variedad de envases alimentarios y en recubrimientos de productos enlatados. Por estos motivos, y por su alta demanda, el BPA es uno de los productos industriales más empleados, lo que inevitablemente repercute en un gran riesgo de contaminación del medio ambiente (4).

La estructura química polifenólica del Bisfenol A (BPA) (4,4'-(propano-2,2-diil)-difenol (Fig. 1.1) es similar a la de las hormonas estrogénicas, por ejemplo, estradiol o dietil-estilbestrol, por lo que tiene gran afinidad por receptores estrogénicos y forma parte de un grupo muy extenso e importante de **contaminantes emergentes** (calificados así recientemente por la UE) denominados **disruptores endocrinos** [(3) (4)]. Estos compuestos son capaces de alterar el sistema hormonal, ocasionando graves daños sobre la salud de los seres vivos expuestos al mismo [(4) (5)]. Por ejemplo, el BPA está asociado a enfermedades cardiovasculares, disfunciones sexuales, obesidad, carcinogenicidad, neurotoxicidad y problemas de desarrollo [(3) (4)].

El problema contaminante del BPA se agrava sinérgicamente por la presencia de micro- y nanoplásticos contaminando el medio ambiente (6). Los **microplasticos (μPs)** son plásticos cuyo tamaño de partícula es inferior a ≤ 5mm. En las últimas décadas se ha constatado un gran aumento de la concentración de los mismos en los océanos, aguas naturales y suelos, como consecuencia de su alta producción, utilización en numerosos productos de uso diario, y su incompleta gestión como residuo contaminante o reutilización [(7) (8)]. Se estima que la cantidad mundial total de μPs que terminan en el medio ambiente excede de 320 millones de toneladas, de las que aproximadamente el 10% terminan en el medio ambiente acuático (9).

Existen muchos **tipos de μPs** los cuales difieren en su composición, tamaño, forma, densidad entre otras características. Dada que su densidad es menor a la del agua normalmente estos se encuentran en la superficie de la misma flotando, pero con el

tiempo, y a causa de las condiciones meteorológicas y/o acción de agentes químicos y/o biológicos la flotabilidad de los mismos se puede ver afectada, resultando en una distribución de μPs dispersos a distintas profundidades (4). Debido al alto peso molecular de los μPs, su hidrofobicidad y la inexistencia de especies microbianas capaces de metabolizar polímeros en la naturaleza, los plásticos son extremadamente resistentes a la biodegradación [(7) (10)].

Los μPs constituyen por sí mismos un grave problema medioambiental, asociados a monómeros tóxicos sin polimerizar, aditivos y toda clase de **compuestos orgánicos tóxicos persistentes**. Los μPs tienen una gran capacidad de adsorción sobre estos compuestos orgánicos (tóxicos en su mayor parte) vertidos en ríos, mares y océanos (11) aumentando notablemente su dispersión y su toxicidad al concentrarse hasta en órdenes de 10^6 [(3) (6) (10)].

Existen un buen número de técnicas analíticas instrumentales muy sensibles y selectivas para la **detección y cuantificación de BPA**. De entre ellas, y con una finalidad de control medioambiental, predominan las técnicas de cromatografía líquida asociadas a detectores de espectrometría de masas, con límites de detección (LODs) del orden de muy pocos ppb´s (11). Sin embargo, los procedimientos de determinación de BPA en matrices biológicas o medioambientales requieren de procesos previos de extracción y limpieza de la matriz de estas muestras.

También se han desarrollado multitud de **sensores químicos y biosensores**, sobre todo de transducción electroquímica dadas las propiedades electroactivas del BPA [(3) (12)]. Gran parte de estos sensores electroquímicos se basan en superficies transductoras nanoestructuradas, que mejoran notablemente sus propiedades analíticas, sobre todo en relación a la electrocatálisis y a la sensibilidad de medidas de la corriente como señal analítica [(3) (12) (13)]. Los nanomateriales utilizados incluyen nanotubos de carbono, grafeno, nanopartículas metálicas, nanocomposites o *quantum-dots* (3). También se han desarrollado inmunosensores (utilización de anticuerpos como elementos de selectividad) y aptasensores (basados en mono-secuencias cortas de DNA/RNA que se pliegan específicamente sobre el BPA) para la creación de novedosos biosensores de BPA, con LODs que llegan a concentraciones del orden de 10^{-6} a 10^{-9} M. [(3) (12)].

Paralelamente al desarrollo de biosensores electroquímicos de BPA, también se han desarrollado diversos **procedimientos electroquímicos**, sobre todo métodos voltamétricos con electrodos modificados con nanomateriales (nanoestructurados) [(12) (13)]. El BPA puede oxidarse con potenciales anódicos, aunque presenta el problema de la formación de polifenoles electropolimerizados que pasiva fácilmente la superficie de los electrodos de trabajo, por lo que es necesario su limpieza frecuente o realizar la nanoestructuración que dificulte o elimine esta pasivación (14). Los limites de detección

son del mismo orden que los de los sensores electroquímicos, frecuentemente entre el μM y nM de BPA.

Los **microplásticos** constituyen un problema de primer orden debido a su amplia presencia contaminante del medio ambiente. Además de su propio efecto perjudicial sobre el medio ambiente, pueden contener dos tipos de contaminantes químicos: las materias primas empleadas en su fabricación (monómeros, oligómeros, aditivos plastificantes, antioxidantes, estabilizantes o retardadores de combustión) y los contaminantes persistentes orgánicos tóxicos retenidos sobre su superficie [(6) (11)]. Éstos últimos se adsorben fácilmente y en grandes concentraciones (traza, ppt´s a ppm´s) por las características hidrófobas de los μPs y su alta relación área/volumen, produciendo un efecto contaminante sinérgico enorme. Particularmente, existe una gran preocupación creciente sobre la presencia contaminantes disruptores endocrinos (incluso en lugares remotos de los océanos), especialmente de BPA empleado en la propia fabricación de los plásticos y como fármaco, así como su difícil remediación en los procesos de tratamientos de aguas residuales (4). Se documenta, por ejemplo, la presencia de BPA en distintos tipos de aguas (superficiales, subterráneas, plantas de tratamiento, agua de bebida) en concentraciones de hasta el orden de 35 ng L^{-1} (0,035 ppb´s), lo que constituye un problema de salud pública de primer orden (al transmitirse a la cadena alimentaria) y justifica una muy intensa investigación para la disminución o eliminación (remediación) de este tipo de contaminantes orgánicos persistentes (4). Agravado por su concentración (adsorción) sobre μPs.

En **este trabajo**, en primer lugar, se pone a punto un **método voltamétrico** para la determinación sensible de **BPA**, optimizando y explorando la nanoestructuración de mini-electrodos de trabajo de carbón vítreo (Φ ~3 mm), y controlando la pasivación del electrodo por la formación de polifenoles sobre su superficie. El procedimiento voltamétrico es aplicado a continuación en el estudio de la **interacción del BPA** con micropartículas de distintos polímeros plásticos, para cuantificar y comparar las capacidades de adsorción (de concentración) de BPA sobre la superficie de estos μPs. Típicamente, este tipo de estudios requieren de complicados procesos de separación/ extracción de los contaminantes orgánicos sobre los μPs [(6) (9) (11)]. Uno de los objetivos de este trabajo es aportar nuevos procedimientos rápidos para la cuantificación del BPA junto al estudio y caracterización de su interacción con μPs utilizando procedimientos de separación sencillos.

Instrumentación y Reactivos

Para la realización de la parte experimental se emplearon los **reactivos** e **instrumentación** indicados en este apartado.

Bisphenol A (Alfa-Aesar, Ref. A10324). Se preparo una disolución concentrada de 30 mM disolviéndolo en agua destilada con ayuda de ultrasonidos, sin necesidad de etanol al no superar su solubilidad. Las experiencias electroquímicas (voltametría) se llevaron a cabo empleando como electrolito soporte disoluciones 0,1M de KCl (Sigma-Aldrich). Como mediador electroquímico se empleó ferrocianuro potásico (Sigma-Aldrich).

Para las modificaciones químicas (nanoestructuración) de los electrodos de trabajo se utilizaron óxido de grafeno (*graphene oxide*, Metrohm Dropsens, ref. 70001404), reactivos generales KH_2PO_4, K_2HPO_4 (Fisher, Ref. 1712602).

Los **instrumentos** utilizados para las medidas electroquímicas fueron (ver Figs. del Anexo):

- **Potenciostato** µAutolab-III (Metrohm). Resolución ±1 nA, ±0,1 mV. Con módulo FRA2 para medidas de impedancia electroquímica (10 kHz a 10 µHz). *Software* de control NOVA v.2.1.2 (Metrohm).
- Agitador orbital Reax 02 (Heidolph, Ref. 200473492).
- Centrifugadora Heraeus Multifuge X1R (Thermo Scientific, Ref. 41223274).
- Balanza de precisión AG245 (reproducibilidad ±0,1mg).
- Baño líquido con generación de ultrasonidos Sonorex (Bandelin).
- Microscopio óptico de luz reflejada Axio Imager (Carl Zeiss) con luz polarizada.
- Material de uso general de laboratorio: pipetas y micropipetas, vasos precipitados, erlenmeyers, varilla de vidrio, cubetas y tubos *eppendorf*.

Se utilizaron los siguientes **electrodos** voltamétricos (BASi-BioAnalytical Systems):

- Electrodo (mini) de carbono vítreo (GCE, *glassy-carbon electrode*) (diámetro Φ=3 mm, ref. MF-2012, BAS-i).
- Electrodo (mini) de referencia Ag/AgCl (ref. MF-2079, BAS-i).
- Electrodo (mini) auxiliar de hilo de platino (BAS-i, ref. MW-4130).

Para obtener las distribuciones de tamaño de los microplásticos a partir de las microfotografías obtenidas con el microscopio óptico, se empleó el software de uso público ***ImageJ*** (v.1.8.0_172, https://imagej.nih.gov/ij).

Procedimientos experimentales

Limpieza y pulido de los electrodos GCE-*bare*

Dada la facilidad con la que se quedar fuertemente retenidos los polifenoles formados electroquímicamente, es preciso regenerar la superficie de los electrodos GCE-*bare* (sin modificar) en medidas sucesivas. Después de su lavado con agua, se pulieron con óxido de alúmina (5 µm diámetro) frotando sobre un paño de fieltro durante aproximadamente 5 min. Finalmente se lavó el electrodo con agua destilada para eliminar cualquier resto de alúmina sobre su superficie. Para una limpieza más profunda del GCE-*bare*, y eliminación de BPA adsorbido, se realizaron adicionalmente tratamientos con ultrasonidos en alcohol etílico durante 5 min., previamente a su lavado y pulido.

Caracterización del electrodo de trabajo GCE-*bare* mediante voltametria cíclica

Para conocer la superficie real de los electrodos GCE-*bare* y su comportamiento electroquímico (muy dependiente de su estado superficial y/o pulido previo), se midieron voltagramas cíclicos del mediador de transferencia de carga (ferrocianuro potásico 5 mM en KCl 0,10 M. como electrolito soporte), desde -1V a +1V a distintas velocidades de barrido (entre 50 y 200 mV s^{-1}). Empleando la ecuación de *Randles Sevcik* calculamos el diámetro de nuestro electrodo de trabajo, que mediante la equivalencia faradaica se corresponde con su área real.

Cuantificación del BPA mediante voltametrías de pulso diferencial (DPV)

Para cuantificar la concentración de BPA en disolución, se empleó la técnica voltamétrica de barrido diferencial de pulsos (DPV, *differential-pulse voltammetry*), una de las más sensibles. Se realizaron barridos de potencial DPV (ΔE_p=25 mV; ΔE=5 mV; v=5 mV s^{-1}) en potenciales desde +0,3V hasta +0.9 V. (para minimizar la formación de polifenoles a potenciales más anódicos). Se realizaron curvas de calibración de BPA entre concentraciones de 3,0 a 30,0 µM (0,68-6,85 µg mL^{-1}).

Nanoestructuración de los electrodos de trabajo GCE-*bare* (GO y rGO).

Con el objetivo de mejorar la sensibilidad y velocidad de transferencia de carga sobre el BPA de los electrodos GCE, se depositaron con micropipeta sobre su superficie *bare* (sin modificar) distintos volúmenes (3 a 15 µL) de *Graphene oxide* (GO), sobre el electrodo GCE-*bare*, previamente lavado y pulido. Se dejó secar a temperatura ambiente durante 24 h, y se empleó de esta manera en las medidas de cuantificación de BPA en disolución. Se depositaron concentraciones de 0,5 mg mL^{-1} y 1 mg mL^{-1} de GO.

A partir de los electrodos modificados anteriores GCE-GO, se prepararon voltamétricamente electrodos de *graphene* reducido (GCE- rGO), en disoluciones de tampón fosfato $H_2PO_4^-/HPO_4^{-2}$ 0,10 M. (pH=7), mediante voltametría cíclica en un rango de potenciales de -0,2 a -1,8 V. (vbp.=50 mV s^{-1}; n= 10 ciclos).

Dada la imposibilidad de pulir físicamente los electrodos GCE modificados, entre medidas consecutivas se regeneraron mediante un procedimiento electroquímico con el objetivo de eliminar posibles polímeros del BPA electropolimerizados en las medidas voltamétricas a potenciales anódicos, y que tienden a retenerse sobre la superficie del *glassy-carbon*. Para ello se aplicó un potencial constante E_e=-0,5 V durante un tiempo de electrólisis t_e=90 s., en disolución acuosa de KCl 0,1 M. como electrolito soporte. Este tratamiento de limpieza electroquímica del electrodo modificado se aplicó de una medida voltamétrica de BPA a la siguiente.

Preparación de los microplásticos (µPs)

Se estudiaron 2 tipos de µPs: (1) poliestireno (PS); y poliestireno expandido (EPS). Mediante lijado de diferentes objetos plásticos de uso diario, con papeles de lija de diferentes tamaños de grano (numeración 320 para PS y 400 para EPS) se obtuvieron los correspondientes microplásticos (µPs) en forma de un polvo finamente dividido. Para obtener 2 g. de los µPs, el lijado tomó aproximadamente 4 h. Posteriormente, se caracterizó mediante microscopía óptica el tamaño de estos µPs empleando el software *ImageJ* (v.1.8.0_172), obteniéndose distribuciones de tamaño en torno a diámetros medios de entre 40 y 80 µm. Se prepararon de esta forma µPs de PS y EPS, a partir de vasos de café y *porexpan* (EPS, material plástico espumado compuesto de un 98% de aire, muy ligero y muy empleado en embalajes y como aislante termico y acústico), respectivamente.

A partir de los µPs sólidos, se prepararon dispersiones alícuotas en agua en volúmenes de 2,0 mL (tubos *eppendorf*), en concentraciones de 0,2/0,4/0,8 y 1,6 mg mL^{-1}. Sobre estas dispersiones de µPs se añadió un volumen de BPA para obtener concentraciones finales de [BPA]=8,0 mM, para estudiar su interacción. Al objeto de calcular las cinéticas de adsorción del BPA sobre los µPs, se controló el tiempo de contacto del BPA con las dispersiones de los µPs.

Estudio cinético de la interacción del BPA con los microplásticos

Las dispersiones de los µPs (en distintas concentraciones alícuotas) se pusieron en contacto en tubos *eppendorf* (2,00 mL totales) con una concentración 8,0 mM de BPA, controlando el tiempo de adsorción (entre 0,0 y 72,0 h.) y manteniendo agitación de volteo vertical orbital. A continuación, se realizó la separación de los µPs sólidos de la disolución, y se tomó rápidamente una alícuota de la disolución (200 µL) para las medidas

de la concentración de BPA disuelto, una vez realizada la separación centrifugando a 7500 rpm durante 10 minutos los tubos *eppendorf* correspondientes. Sobre esta disolución, se midió con DPV la concentración de BPA empleando electrolito soporte 0,10 M. de KCl. De esta forma, se obtuvo la concentración de BPA no adsorbido por los µPs, y por diferencia a partir de la concentración inicial de BPA la cantidad de BPA adsorbido por unidad de masa de los µPs. Así mismo, se realizaron medidas de control de BPA en ausencia de µPs y después del mismo procedimiento de separación por centrifugación, y en las que no hubo pérdidas significativas de BPA durante este proceso. Para las medidas voltamétricas DPV se emplearon electrodos de trabajo GCE-*bare*, que se mostraron en el estudio experimental realizado mucho más reproducibles que los electrodos nanoestructurados con GO y rGO.

Resultados y Discusion

Caracterización voltamétrica de los electrodos de trabajo (GCE-*bare*)

El objetivo de las medidas voltamétricas en este trabajo es la cuantificación DPV sensible y rápida del BPA en la disolución. Los materiales de electrodo más adecuados para la oxidación del BPA (*bisphenol A*) son los derivados del carbono, por lo que se emplearon electrodos de trabajo de carbón vítreo (*glassy-carbon*, GCE) que presentan muy baja porosidad y, por lo tanto, bajas corrientes capacitativas residuales. Son los electrodos de carácter orgánico más empleados, sin embargo, tienen como inconveniente la necesidad de ser regenerados con frecuencia (mediante lavado/pulido físico) al tener una gran capacidad de retención de los productos de las reacciones electroquímicas. Particularmente, en la oxidación del BPA se producen polifenoles por electropolimerización, lo que agrava el problema.

Es conocida la gran dependencia de las medidas voltamétricas con respecto al estado superficial del electrodo. Por lo que es aconsejable caracterizarlo de alguna manera, también como comparación del comportamiento electroquímico de electrodos GCE diferentes en la determinación de BPA. Una forma sencilla, es empleando un mediador de transferencia de carga (mtc), por ejemplo, ferrocianuro en una concentración precisa, y medir las alturas de los picos voltamétricos (voltametría cíclica) a distintas velocidades de barrido de potenciales (vbp, v). De forma teórica, y a través de la equivalencia faradaica, ha de cumplirse la llamada ecuación de *Randles-Sevcik*:

$$Ip = 2{,}69 * 10^5 * n^{\frac{3}{2}} * v^{\frac{1}{2}} * D^{\frac{1}{2}} * A * c$$

Siendo n, el número de electrones transferidos en el evento redox; v, la velocidad de barrido (V s^{-1}); D, el coeficiente de difusión del ferrocianuro (cm^2 s^{-1}); A, el área del electrodo (cm^2) y c, la concentración (mol cm^{-3}). De esta ecuación, todos los datos son constantes a excepción de la altura del máximo del pico voltamétrico (I_p) y la velocidad del barrido de potenciales (vbp), por lo que las podemos agrupar en una única constante (k), que podemos calcular como valor medio de las distintas medidas, al representar la velocidad de barrido ($V\ s^{-1}$) frente a la altura del pico (I_p). Los resultados se muestran en la Fig. 0.1.

V (mV/s)	$V^{1/2}$	Ip (A)
50	7,07	2,50E-05
100	10,0	3,20E-05
150	12,2	3,60E-05
200	14,1	3,90E-05

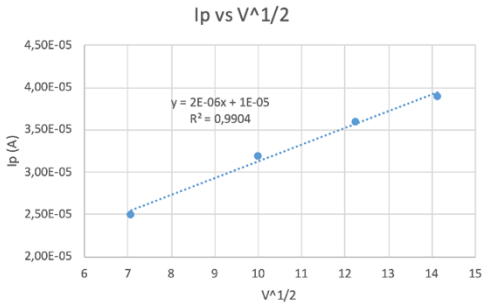


Figura 0.1. Valores de Ip de los picos voltamétricos anódicos medidos en función de la vbp por voltametría cíclica. Disoluciones de ferrocianuro 5mM en KCl 0,10 M. Relación lineal de Ip frente a la raíz cuadrada de la vbp.

Se midió únicamente el pico anódico, y de forma experimental se observó una relación lineal de I_p que aumenta con $v^{1/2}$ (I_p=k· $v^{1/2}$), lo que se cumple teóricamente en corrientes limitadas por la velocidad de difusión. A partir de estas medidas a distintas vbp, se calculó el área real de los electrodos GCE-*bare* (sin modificar), que puede variar en función de su rugosidad o estado superficial, o simplemente de un electrodo a otro.

La ecuación *Randles- Sevcik*, basada en la equivalencia faradaica, permite calcular el área real del electrodo, valor que comparamos con su área geométrica en términos del diámetro del electrodo GCE-*bare* (valor teórico indicado por el fabricante: ϕ=3,0 mm). Por ejemplo, en el electrodo nº 1 se obtuvo un área real correspondiente a ϕ=2,7 mm, algo menor que el valor geométrico. El motivo fue un pasivado de la superficie GCE-*bare* (nº 1), aunque muy sensible a su pulido físico, dado que aumentó su área después de este pulido, hasta mantenerse constante. Por lo que, la utilidad de esta medida es la de comprobar y controlar el estado superficial del electrodo, pero sobre todo comparar electrodos de trabajo GCE-*bare* diferentes. En trabajos precisos de medidas de una misma magnitud, y para evitar diferencias, se realizaron medidas con un mismo electrodo GCE para evitar esta variable.

Modificación (nanoestructuración) de los electrodos CGE-*bare*

En este apartado se describe la modificación física de los electrodos de trabajo GCE-*bare* con nanomateriales de grafeno, para mejorar sus propiedades electroquímicas en su posterior uso para la cuantificación voltamétrica de BPA en disolución. Los procedimientos se detallan en el apartado experimental anterior.

Se ensayaron distintas cantidades de *graphene oxide* (GO) depositadas físicamente, que quedan fuertemente adheridas sobre el GCE-*bare* permitiendo su fácil modificación. A partir de electrodos GCE-GO, se fabricaron además electrodos nanoestructurados con óxido de grafeno reducido (rGO), mediante la reducción electroquímica del GO (ver los procedimientos experimentales). Normalmente, el rGO suele tener mayores conductividades y capacidad de electrocatálisis que el GO. Los objetivos de la nanoestructuración fueron aumentar la superficie del electrodo de trabajo (ET),

midiéndose mayores corrientes, y mejorar su electrocatálisis (oxidar al BPA a menores potenciales anódicos).

Las cantidades de GO incorporados a los electrodos GCE-*bare* (sin modificar) en este estudio, se muestran en las tablas 0.1 y 0.2.

Volumen añadido (µL)	3	5	10	15	10	15
Concentración GO (mg mL^{-1})	0,5	0,5	0,5	0,5	1	1

Tabla 0.1. Volúmenes y concentraciones de graphene oxide añadidos a los electrodos GCE-bare para su nanoestructuración física, obteniendo electrodos GCE-GO.

Volumen añadido (µL)	3	5	10	15	10
Concentración GO (mg mL^{-1})	0,5	0,5	0,5	0,5	1

Tabla 0.2. Volúmenes y concentraciones de las dispersiones de graphene oxide añadidos a los electrodos GCE-bare para su nanoestrcuturación posterior, obteniendo electrodos modificados GCE-rGO.

Los resultados en la determinación de una misma concentración en disolución de BPA (corrientes máximas de los picos voltamétricos DPV, I_p), para los 3 tipos de electrodos, se resumen en la tabla 0.3.

I_p GCE-*bare* (µA)	**I_p GCE-*GO* (µA)**	**I_p GCE-*rGO* (µA)**	**Modificación realizada**
0,16	0,15	0,24	3µL (0,5mg mL^{-1})
0,16	0,40	0,17	5µL (0,5mg mL^{-1})
0,16	0,31	0,29	10µL (0,5mg mL^{-1})
0,16	0,13	0,29	15µL (0,5mg mL^{-1})

Tabla 0.3. Altura de pico de medidas voltamétricas DPV repetidas de disoluciones 20µM de BPA, empleando los electrodos GCE modificados (GO, rGO) y sin modificar (bare).

En la Fig. 0.2 se muestran voltagramas DPV típicos de las medidas voltamétricas de BPA de los 3 tipos de electrodos GCE estudiados (*bare, GO, rGO*). Como conclusión de los resultados mostrados en la tabla 0.3 y Fig. 0.2, una mayor cantidad de GO depositado en general disminuye la sensibilidad a partir de un valor optimo (5µL; 0,5mg mL^{-1}), mientras mayores cantidades de *GO* en la formación del *rGO* mejora las corrientes. Por lo tanto,

se ve claramente que la nanoestructuración del electrodo GCE-*bare* aumenta las corrientes, resultado esperable al aumentar el área de los ET. Sin embargo, un exceso de GO provoca una cierta pasivación del ET, por el motivo de no ser un buen material de electrodo comparado con el *rGO*, en cuanto a su conductividad electrónica. En cuanto a su capacidad electrocatalítica (capacidad de mejorar la velocidad de transferencia de electrones, que hace que los picos voltamétricos aparezcan a menores potenciales, ver fig. 0.2), el GO produce mayor electrocatálisis, mientras que este efecto no se aprecia significativamente en el rGO con respecto al GCE-*bare* en los voltagramas anódicos DPV del BPA en disolución.

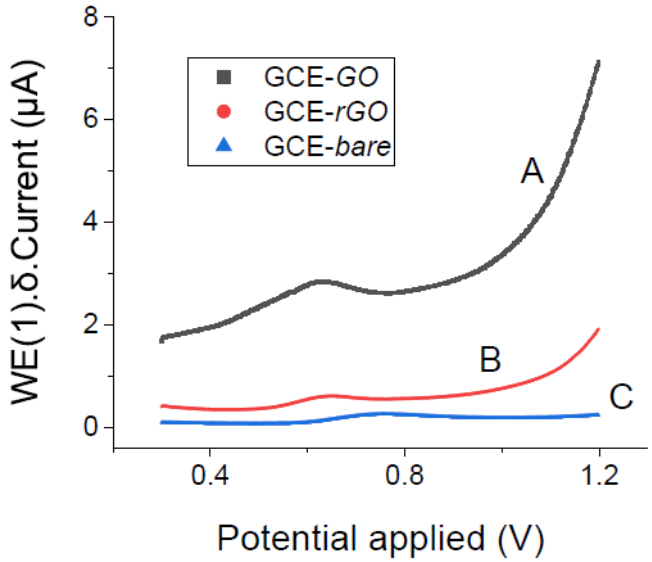


Figura 0.2. Voltagramas DPV de una disolución BPA 20μM empleando electrodos (A) GCE-GO y (B) GCE-rGO modificados con 10 μL de graphene oxide (0,5mg mL^{-1}) y (C) GCE-bare sin modificar.

Se realizó un estudio similar con voltametría cíclica del comportamiento en disoluciones de ferrocianuro como mediador de transferencia de carga (mtc) de estos 3 tipos de electrodos, comprobando los valores de *Ip* (picos anódicos) y la reversivilidad electroquímica (diferencia de los potenciales de los máximos de los picos anódico y catódico: ΔE_p (V)=$E_{p,a}$ – $E_{p,c}$). Menores valores de ΔE_p (V) significan mayores valores de vtc (mayor reversibilidad electroquímica). Menores valores de $E_{p,a}$ significan mejor electrocatálisis, y valores mayores Ip mejor sensibilidad en las corrientes medidas del metc. Los voltagramas cíclicos correspondientes (n=2 ciclos) se muestran en la fig. 0.3. En general, la disminución del primer ciclo al 2º significa una cierta pasivación de los ET por el depósito de polifenoles formado durante las medidas CV.

GCE-*bare*		GCE-GO		GCE-rGO		Modificación realizada
Ip (µA)	**ΔE_p (V)**	**Ip (µA)**	**ΔE_p (V)**	**Ip (µA)**	**ΔE_p (V)**	
25	0,25	31	0,18	32	0,16	3µL (0,5mg mL^{-1})
25	0,25	28	0,17	36	0,13	5µL (0,5mg mL^{-1})
25	0,25	76	0,14	42	0,14	10µL (0,5mg mL^{-1})
25	0,25	40	0,11	30	0,14	15µL (0,5mg mL^{-1})
25	0,25	38	0,10	44	0,10	10µL (0,5mg mL^{-1})

Tabla 0.4. Valores de Ip y ΔE_p de voltagramas cíclicos en disoluciones 5mM de ferrocianuro con los 3 tipos de electrodos estudiados.

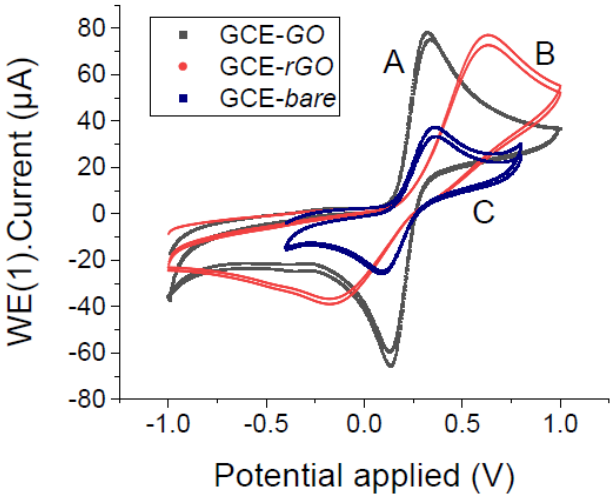


Figura 0.3. Voltagramas cíclicos de Ferrocianuro 5mM a 50mV s^{-1} con los electrodos de trabajo (A) GCE-GO y (B) GCE-rGO modificados con 10µL de Graphene oxide 0,5mg mL^{-1}; y (C) con electrodo de trabajo GCE-bare.

Los resultados del mtc muestran que el GO produce un muy pequeño efecto electrocatalítico sobre el ferrocianuro con respecto al GCE-*bare*, mientras que con el GCE-*rGO* ocurre lo contrario. Ambas nanoestructuraciones producen un aumento de la superficie y mayores corrientes. Sin embargo, el resultado con respecto a la electrocatálisis no es extrapolable al BPA, al tratarse de moléculas diferentes, con un mayor carácter orgánico e inorgánico.

Otros aspectos importantes de los electrodos empleados en la cuantificación del BPA son su reproducibilidad, resistencia a la formación de polifenoles, y su limpieza. Si bien la nanoestructuración mejora la sensibilidad, se observó que medidas consecutivas disminuían las corrientes, debido a la pasivación producida por los polifenoles (electropolimerización) formados durante las medidas anódicas del BPA (especialmente

con el electrodo GCE-*GO)*. Por lo que es necesario en todos los casos la limpieza y regeneración de los ETs. En el caso del GCE-*bare*, su limpieza y pulido entre una medida y la siguiente produjo excelentes resultados de reproducibilidad. En los electrodos nanoestructurados no es posible el pulido físico, por lo que se regeneraron electroquímicamente (ver en procedimientos experimentales).

Para estudiar lo anterior y su tiempo de vida, con un mismo electrodo GCE-*GO* se realizaron 2 medidas DPV diarias de BPA (20µM), sin regeneración electroquímica. Los resultados se resumen en la Tabla 0.5 y Fig. 0.4. Se observa una disminución apreciable de I_p en la 2ª medida de BPA con respecto a la 1ª, debido a la pasivación del electrodo, en una primera etapa (las 6 primeras medidas en donde no se regeneraba el GCE-*bare*, desde el 23-feb. al 9-mar.). Con el mismo GCE-GO empleado en esta etapa, se ensayó a continuación su limpieza (regeneración) electroquímica, obteniéndose resultados mucho más reproducibles. Aun cuando la sensibilidad disminuye rápidamente en las primeras medidas después de la fabricación del ET modificado, posteriormente alcanza valores más reproducibles durante un tiempo de vida razonable.

Fecha	***23-feb***	***28-feb***	***02-mar***	***04-mar***	***08-mar***	***09-mar***
1ª medida (µA)	0,51	0,31	0,079	0,13	0,071	0,038
2ª medida (µA)	0,21	0,18	0,095	0,043	0,052	0,038
Fecha	**10-mar**	**16-mar**	**18-mar**	**24-mar**	**28-mar**	**30-mar**
1ª medida (µA)	0,078	0,10	0,089	0,063	0,064	0,069
2ª medida (µA)	0,036	0,039	0,026	0,057	0,058	0,063

Tabla 0.5. Valores Ip de la primera y segunda medida DPV diaria de BPA 20µM, en días sucesivos, con el electrodo GCE-GO modificado con 10µL de GO 0,5mg mL^{-1}.

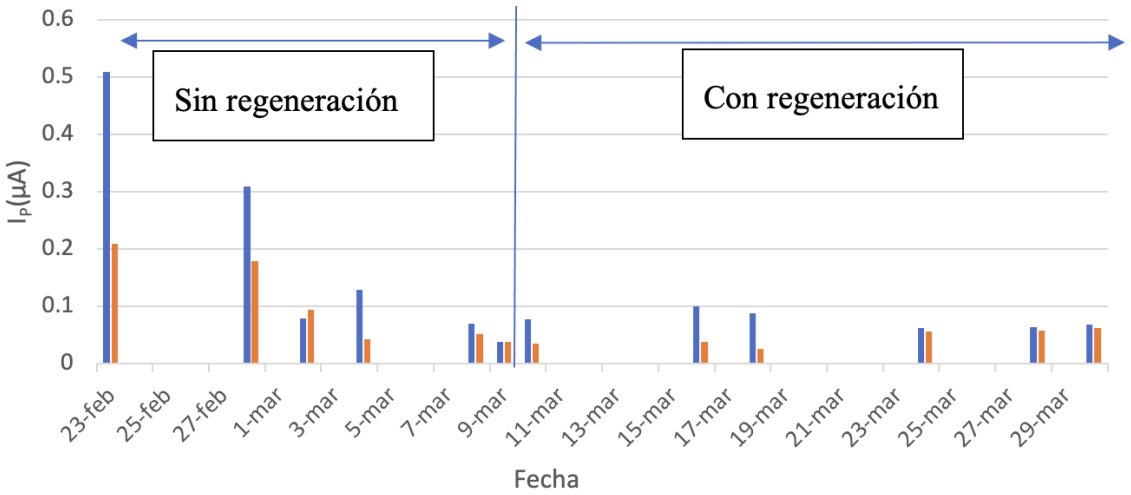


Figura 0.4. Representación de la altura de los picos en la primera y segunda medida con el transcurso del tiempo. Cuantificación del BPA en las mismas condiciones que las de la tabla 5. Mejora de la reproducibilidad trabajando sin regeneración y con la regeneración electroquímica del GCE-GO.

En el otro extremo, el electrodo GCE-*bare* muestra resultados muy reproducibles en medidas de BPA repetitivas (desviaciones estándar relativas aproximadas del 5%RSD para n=6 medidas de BPA 20 µM) cuando se procede a su limpieza/pulido. En conclusión, y para su uso en la cuantificación de pequeñas concentraciones de BPA en su interacción con microplásticos, se escogió este electrodo, a pesar de una menor sensibilidad en la cuantificación del BPA, pero por su mayor reproducibilidad. El pulido del ET entre cada medida voltamétrica no es un gran inconveniente, pues se realiza en muy pocos minutos.

El efecto de la limpieza y pulido de los electrodos GCE-*bare* en la cuantificación DPV de disoluciones 50 y 100 µM de BPA se muestran en la tabla 0.6 y en la fig. 0.5. La limpieza/pulido de los electrodos GCE-*bare* produjo de forma muy notable un aumento de la sensibilidad de las medidas y la mejora de la reproducibilidad de las medidas voltamétricas. Tal como se ha indicado anteriormente, se escogió el electrodo GCE-*bare* como el más adecuado para el estudio de la interacción del BPA con los microplásticos, en la forma como se detalla en el apartado posterior de este trabajo.

Concentración BPA (µM)	***I_p pre*-pulido (µA)**	***I_p post*-pulido (µA)**
50,0	0,13	0,50
100,0	0,34	1,22

Tabla 0.6. Alturas máximas de pico(Ip) antes y después del pulido realizado después de medidas DPVs de BPA 50 y 100µM BPA, empleando electrodos GCE-bare.

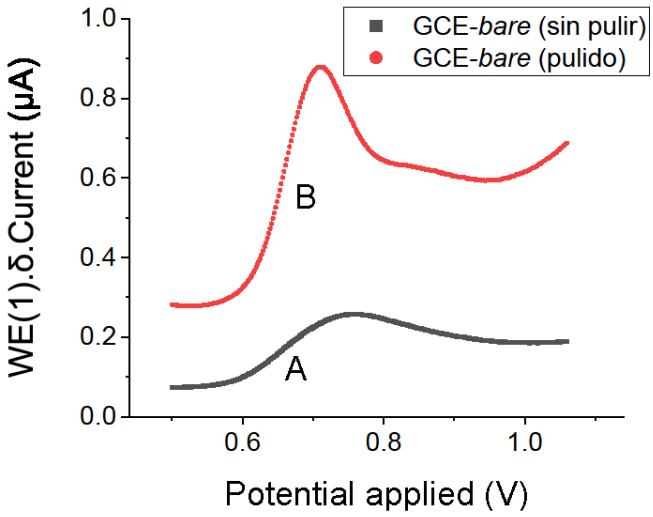


Figura 0.5. Voltagramas DPV tipicos de BPA 50μM en disolución: (A) antes y (B) después del pulido del electrodo GCE-bare.

Estudio de la interacción (adsorción) del BPA sobre microplásticos

El objetivo más importante de este trabajo es el estudio de la capacidad de adsorción del BPA sobre microplásticos, empleando un método sencillo y rápido. Esto tiene una gran importancia medioambiental, pues además de la contaminación intrínseca de los propios μPs éstos pueden preconcentrar otros contaminantes orgánicos presentes en el medio, debido a su capacidad de adsorción y retención, agravando el problema contaminante sinérgicamente.

Lo que se llevó a cabo y se describe en esta parte de la memoria fue la obtención física de microplásticos por lijado de diversos materiales de uso común, la caracterización de su tamaño mediante microscopía óptica, y el estudio de la capacidad de adsorción del BPA con estos microplásticos. Para esto último, se pusieron en contacto diversas cantidades de dispersiones μPs con una misma concentración en disolución de BPA (8 mM), durante un tiempo controlado (desde 0 a 72 h.) y con agitación orbital de volteo. Después de esta adsorción controlada, se separaron las μPs de la disolución del BPA mediante centrifugación en tubos *eppendorf*, y se tomaron alícuotas de la disolución sobrenadante para cuantificar su contenido en BPA. Por diferencia con respecto a la cantidad de BPA añadida inicialmente, se calculó la cantidad de BPA adsorbido por unidad de masa de μPs y la cinética de adsorción. Las correspondientes isotermas de adsorción se ajustaron a dos modelos para proponer el mecanismo de adsorción de estos microplásticos.

Obtención de los microplásticos y su caracterización por microscopía óptica.

Se han estudiado dos tipos de µPs: (a) Poliestireno (PS), obtenido lijando el plástico de vasos de café, y (b) Poliestireno expandido (EPS), obtenido del lijado de *porexpan*, empleado como protección en embalajes.

En primer lugar, se redujo el tamaño de los plásticos empleando lijas de óxido de aluminio medias/finas (nº de grano 360 para PS y 400 para EPS), obteniéndose partículas cada vez menores durante este proceso de lijado. Para obtener un total de aproximadamente 2 g. de cada µP, se emplearon aproximadamente 4 h. Una vez obtenidas las cantidades necesarias (aproximadamente 2 g.), y agitando el recipiente de vidrio manualmente para obtener una distribución más uniforme, se realizaron sobre pequeñas tomas de muestra micrografías con el microscopio óptico. En las Figs. 0.6 y 0.7 se muestran dos ejemplos, mostrando otras micrografías adicionales en el Anexo (Figs. 1.18 y 1.19).

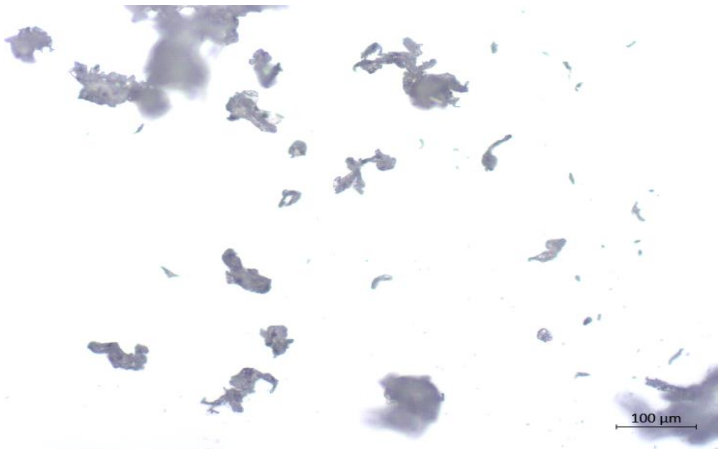


Figura 0.6. Micropartículas de poliestireno expandido (EPS-µPs), tomadas con un aumento x100.

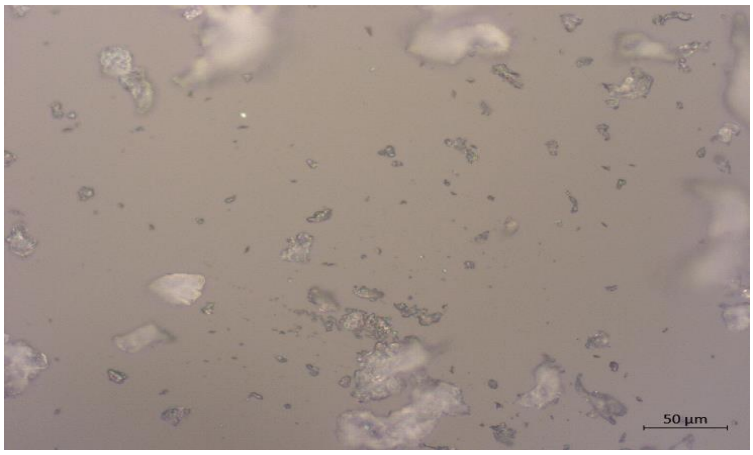


Figura 0.7. Micropartículas de poliestireno (PS-µPs) obtenidas con un aumento x200.

A partir de estas imágenes, se estimaron distribuciones de tamaño de los µPs midiendo manualmente el diámetro/tamaño de las partículas mostradas en cada imagen, y

empleando el software de medida denominado *ImageJ*. Se procedió con la obtención de una estimación del diámetro de los microplásticos mediante la utilización del programa *ImageJ*.

Para el estudio posterior de capacidad de adsorción de BPA, se emplearon microplásticos cuyas distribuciones de tamaños fueron:

- PS: 48.6 ± 9.8 μm.
- EPS: 65.5 ± 13.1 μm.

Estos valores se midieron sobre todas las microfotografías que se realizaron el laboratorio, tanto las mostradas en las dos figuras anteriores (figs. 0.6 y 0.7) como las mostradas en el Anexo (figs. 1.18 y 1.19). De todos los valores medidos (aproximadamente se recogieron 60 medidas de cada uno de los 2 μPs), obteniéndose dos distribuciones de tamaño con los valores valor.medio ± desv.estandar indicados.

Estudio cinético de la adsorción de BPA sobre los microplásticos

Una vez obtenidas las cantidades suficientes de los dos μPs (PS, EPS), se pesaron las cantidades correspondientes de cada uno de ellos y una dispersión de los mismos se puso en contacto con una disolución 8 mM en BPA, manteniendo su contacto durante un tiempo con agitación vertical. Una vez transcurrido ese tiempo, se realizó la separación de la disolución y las micropartículas, para tomar después con una micropipeta un volumen alícuota en el que se realizó la determinación voltamétrica de BPA, tal como se ha mencionado anteriormente y se ha detallado en la parte de procedimientos experimentales de esta memoria. A partir de los resultados medidos se calcularon las cinéticas de adsorción del BPA sobre los microplásticos, así como la capacidad de retención del BPA por unidad de masa de ambos microplásticos (mg de BPA adsorbido/g de μPs). Por norma general, y como se detalla a continuación, se observó una adsorción muy rápida de BPA sobre los μPs en las primeras 0.5-3 h. Después de su puesta en contacto, y una cinética de adsorción mucho más lenta en las horas posteriores, medidas hasta un máximo de 24 h.

A partir de la concentración de BPA en la disolución y la cantidad total de BPA añadido inicialmente se calculó la cantidad de BPA que queda adsorbido sobre los μPs, el porcentaje de BPA adsorbido y la cantidad de BPA adsorbida por unidad de masa de los μPs. Para estos cálculos se emplearon las siguientes ecuaciones:

$$\%EA = \frac{C_0 - C_e}{C_0} \times 100 \quad (eficiencia\ de\ adsorción)$$

$$Q_A = \frac{C_0 - C_e}{m} \times V \quad (capacidad\ de\ adsorción)$$

en donde Q_A es la cantidad de BPA que se adsorbe por gramo (unidad de masa) de µPs (mg g $^{-1}$); C_0 y C_e se refieren a la concentración final y en el equilibrio de BPA en disolución (mg L $^{-1}$), respectivamente; *m* es la masa de los µPs (*g*); y *V* es el volumen en el que se mide la adsorción del BPA (L).

El %EA (eficiencia de la adsorción en unidades porcentuales) significa el porcentaje de BPA que queda adsorbido, y se empleó para estudiar la cinética de adsorción del mismo sobre los µPs, midiendo su valor después de distintos tiempos de estar en contacto empleando agitación vertical. Se comprobó que más allá de 24 h. no se producen porcentajes mayores de adsorción, concentrándose ésta rápidamente en las primeras horas de contacto. Con el valor máximo de %EA se calcularon las capacidades máximas de adsorción del BPA sobre los µPs (QA), cuyas unidades son de mg.BPA/g.µPs (mg g^{-1}).

También se realizaron curvas de calibrado en disoluciones de BPA sometidas al mismo proceso de centrifugación empleado en la separación de los µPs. No se observaron cambios significativos de los parámetros de las ecuaciones de calibrado con disoluciones de BPA centrifugadas y no centrifugadas, por lo que el proceso de separación no influyó en el cálculo de las concentraciones de BPA disuelto.

A partir de los datos de %EA en función del tiempo, se ajustaron las ecuaciones de los datos medidos a dos tipos de modelización de la adsorción con las siguientes ecuaciones:

- Isoterma de ***Langmuir*** (más adecuada a la formación de una sola monocapa adsorbida sobre la superficie de los µPs): $F(x) = \frac{a \cdot b \cdot x^{1-c}}{1+b \cdot x^{1-c}}$

- Isoterma de ***Freundlich*** (más adecuada a la adsorción/retención de multicapas de BPA completadas sobre los µPs): $F(x) = \frac{x}{m} = k \cdot x^{1/n}$; o también en la forma extendida: $F(x) = a \cdot x^{b \cdot x^{-c}}$ y/o abreviada: $F(x) = a \cdot x^{b}$.

A continuación, se resumen los valores obtenidos en condiciones experimentales distintas en función de la cantidad de µPs para la misma concentración de BPA. La representación del %EA se ajustó al modelo *Langmuir* y al modelo *Freundlich* abreviado (los modelos extendidos no convergieron adecuadamente en los ajustes empleados). Para estos estos ajustes de las medidas a las ecuaciones correspondientes (*fittings*) se empleó el *software OriginPro 2020* actualizado (*OriginLab* v.9.7.0.188). Como criterio de mejor ajuste, se compararon los valores de los coeficientes de regresión del ajuste no lineal y los desajustes chi-cuadrado. A continuación, en las Figs. 0.8 a 0.11, se resumen los resultados de estos ajustes y sus parámetros, para los 2 µPs (PS, EPS) y con concentraciones de µPs dispersos de 0,4 y 1.6 mg mL^{-1}. El procedimiento experimental se ha detallado anteriormente.

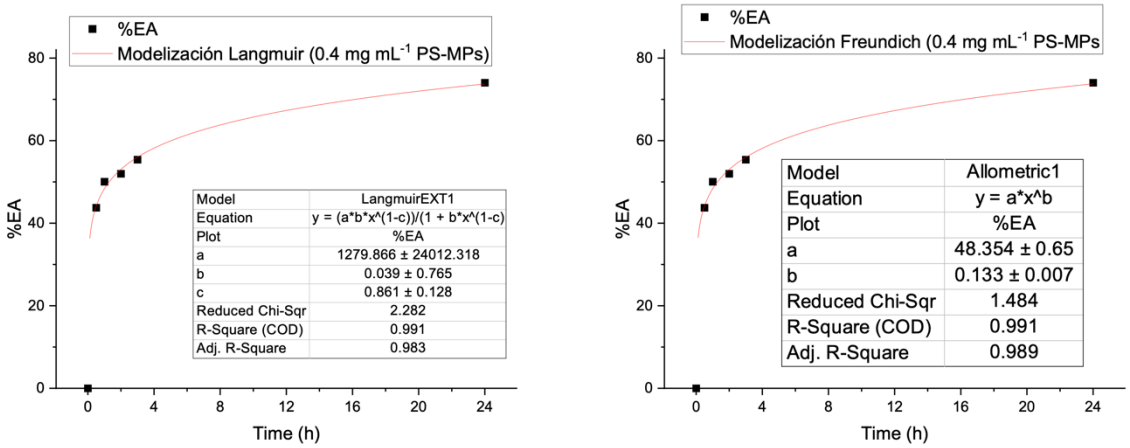


Figura 0.8. Ajustes de modelización del %EA en función del tiempo para la adsorción de BPA 8 mM sobre PS-µPs 0,4 mg mL^{-1}.

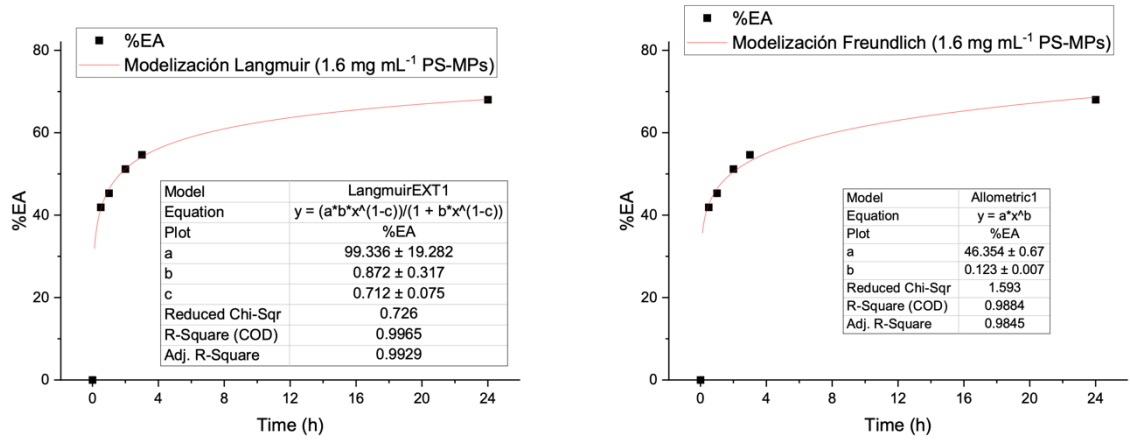


Figura 0.9. Ajustes de modelización del %EA en función del tiempo para la adsorción de BPA 8 mM sobre PS-µPs 1,6 mg mL^{-1}.

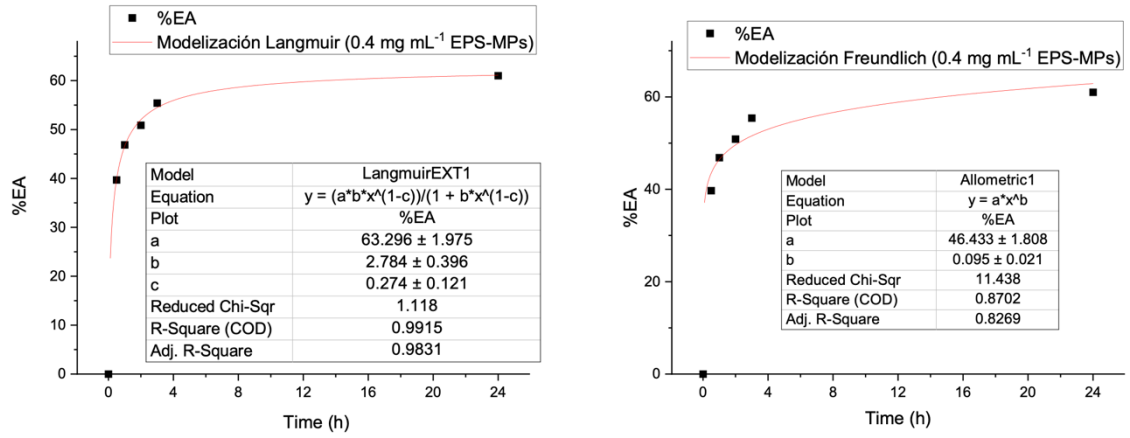


Figura 0.10. Ajustes de modelización del %EA en función del tiempo para la adsorción de BPA 8 mM sobre EPS-µPs 0,4 mg mL^{-1}.

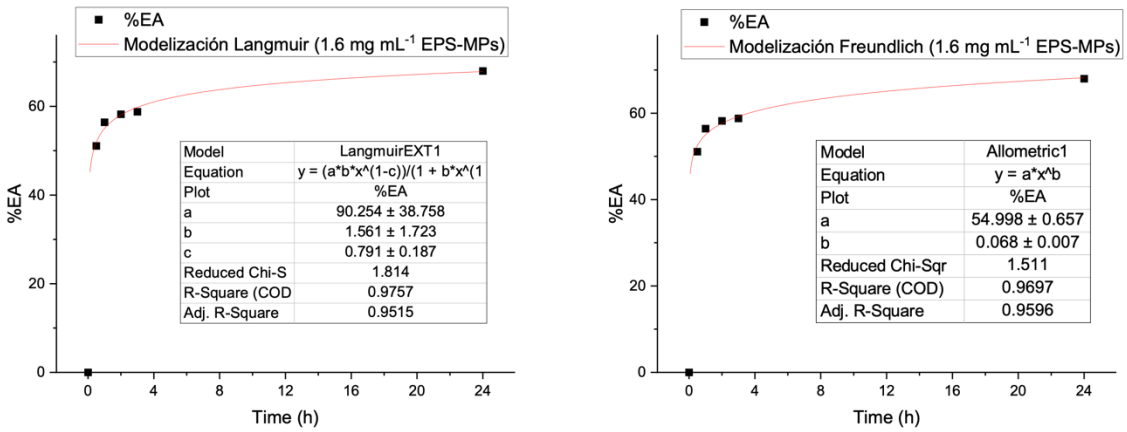


Figura 0.11. Ajustes de modelización del %EA en función del tiempo para la adsorción de BPA 8 mM sobre EPS-µPs 1,6 mg mL^{-1}.

Como consecuencia de los resultados mostrados, se observa una mejor modelización de la adsorción del BPA sobre los µPs con un modelo monocapa en ambos tipos PS y EPS. Lo que significa fuerzas de retención no excesivamente fuertes.

Por otro lado, el cálculo de Q_A para una situación de equilibrio (tiempos de adsorción de 24 h.) nos permite evaluar la cantidad de BPA que puede quedar retenido por ambos microplásticos. En la tabla se resumen los datos calculados Q_A, para los plásticos y las cantidades indicadas.

Concentración de los microplásticos (g L^{-1})	**Tipo de µP**	**Q_A (mg g^{-1})**
0,2	**PS-µPs**	5,66
0,4		3,10
0,8		1,60
1,6		0,84
0,2	**EPS-µPs**	5,48
0,4		2,87
0,8		1,51
1,6		0,78

Tabla 0.7. Capacidad de retención (mg BPA g^{-1} µPs) del BPA en función de distintas cantidades de µPs, para un tiempo de equilibrio de adsorción de 24 h.

Como resultado más importante de las medidas mostradas en la tabla 0.7 es que con mayores cantidades en dispersión de los microplásticos su capacidad de retención

disminuye significativamente. Este resultado coincide con el encontrado por otros autores en estudios similares de adsorción del BPA (9). La explicación a este comportamiento puede deberse a la agregación de las propias micropartículas de plástico en las condiciones experimentales empleadas, que hace que su capacidad de adsorción disminuya notablemente, al disminuir significativamente su relación área por unidad de volumen.

Conclusiones

- Se han **caracterizado electroquímicamente** las superficies de los electrodos de trabajo empleados (GCEs). Si bien las áreas activas de estos electrodos son mayores que las áreas geométricas, y muy dependientes del pulido, la importancia de este apartado ha servido para mejorar la reproducibilidad de las medidas de corriente con un mismo electrodo o comparando electrodos GCE-*bare* distintos.

- Una vez modificadas las superficies de los GCE-*bare* con los nanomateriales *GO* y *rGO*, se compararon las propiedades de estas superficies para las cuantificaciones voltamétricas del BPA en disolución. Las **nanoestructuraciones** mejoraron la sensibilidad de los ETs (mayores corrientes medidas) y la electrocatálisis (disminución del E_p) con respecto al GCE-*bare*, pero las medidas fueron menos reproducibles. Por lo que se escogieron electrodos GCE-*bare* para los estudios reflejados en este trabajo TFG.

- Se desarrolló un procedimiento de **limpieza electroquímica** de los electrodos GCE-*GO* y GCE-*rGO* que mejoró satisfactoriamente la regeneración de estos electrodos en medidas voltamétricas consecutivas (no es posible su pulido físico como en el caso de electrodos GCE-*bare*). Mejorando también su reproducibilidad entre medidas repetidas y tiempo de vida. Aunque, como se ha mencionado en el punto anterior, se emplearon electrodos GCE-*bare* para la cuantificación del BPA en disolución y en el estudio de las interacciones del BPA con los µPs por su sencillez y fiabilidad.

- Se prepararon **µPs** que se caracterizaron por **microscopía óptica**, obteniéndose distribuciones de tamaño de: 48,6±9,8 µm (PS-µPs) y 65,5±13,1 µm (EPS-µPs).

- Estos µPs, en distintas cantidades (dispersiones entre 0,2 y 1,6 g L^{-1}), se pusieron en contacto y con agitación con una concentración constante de BPA (8 mM), en tiempos de 0,5, 1, 2, 3 y 24 h., midiéndose posteriormente la concentración de BPA no adsorbida (DPV). De esta manera, se obtuvieron **curvas isotérmicas de adsorción del BPA sobre los µPs**, observándose su rápida adsorción (en las primeras 0,5-1 h.) y una situación de equilibrio de adsorción a las 24 h. (medidas posteriores a 24 h. no produjeron cambios en la cantidad de BPA adsorbido).

- Las **curvas de adsorción** anteriores se **modelizaron** a un comportamiento de monocapa adsorbida (ecuación expandida de la isoterma de *Langmuir*) y a un modelo de adsorción multicapa (ecuación abreviada de la isoterma de *Freundlich*). Los mejores ajustes (en términos de coeficientes de regresión no lineal de los ajustes y

menores valores de *chi-cuadrado*) se produjeron con el modelo *Langmuir*, lo que sugiere la retención de monocapas de BPA sobre los µPs debidos a fuerzas débiles de adsorción.

- Las máximas **capacidades de retención** del BPA sobre los µPs fueron aproximadamente del orden de entre 0,8-5,7 mg BPA g^{-1} µPs (algo menores en el caso del EPS con respecto al PS). La cantidad (mg) de BPA adsorbido disminuyó al aumentar la cantidad (g L^{-1}) de µPs en dispersión, comportamiento que fue debido a la agregación de las micropartículas de los µPs durante el tiempo de realización de las medidas, que hace que disminuya su relación área/volumen y su capacidad de retener al BPA.

Bibliografía

1. *Production, use, and fate of all plastics ever made.* **Geyer, R and Jambeck, J. R, Law, K. L.** 2017, p. 1. DOI: https://doi.org/10.1126/sciadv.1700782.

2. *Plastics recycling worldwide: current overview and desirable changes.* **d'Ambrières, Woldemar.** pp. 12-21. http://journals.openedition.org/factsreports/5102 .

3. *Recent advances in carbon nanomaterials-based electrochemical sensors for phenolic compounds detection.* **Fu, S.S. et al.** 2021, Microchemical Journal, Vol. 171, pp. 106776-106799. DOI: 10.1016/j.microc.2021.106776.

4. *Sensors and biosensors for analysis of bisphenol-A.* **Ragavan, K.V. et al.** 2013, TRAC, Trends in Analytical Chemistry, Vol. 52, pp. 248-260. DOI: 10.1016/j.trac.2013.09.006.

5. *Toxicity of bisphenol A and its bioaccumulation and removal by a marine microalga Stephanodiscus hantzschii.* **Li et al.** 2009, Ecotoxicology and Environmental Safety, p. 1. DOI:10.1016/j.ecoenv.2008.05.012.

6. *Review - Recent Advances in Electrochemical Sensors and Biosensors for Detecting Bisphenol A.* **Tajik, S. et al.** 2020, Sensors, Vol. 20, pp. 3364-3382. DOI:10.3390/s20123364.

7. *Review-Nanocomposite-Based Sensors for Voltammetric Detection of Hazardous Phenolic Pollutants in Water.* **Patel, B.R. et al.** 2020, Journal of the Electrochemical Society, Vol. 167, pp. 37568-37589. DOI: 10.1149/1945-7111/ab71fa.

8. **Melanie Bergmann, Lars Gutow, Michael Klages.** *Marine Anthropogenic Litter.* 2009. pp. 250. DOI:10.1007/978-3-319-16510-3.

9. *Adsorption mechanisms of five bisphenol analogues on PVC microplastics.* **Wu, P.F. et al.** 2019, Science of the Total Environment, Vol. 650, pp. 671-678. DOI: 10.1016/j.scitotenv.2018.09.049.

10. *The behaviors of microplastics in the marine environment.* **Wang et al.** 2016, pp. 11-13. DOI:10.1016/j.marenvres.2015.10.014.

11. *Methods of analysing chemicals associated with microplastics: a review*. **Hong, S.H. et al.** 2017, Analytical Methods, Vol. 9, pp. 1361-1368. DOI: 10.1039/c6ay02971j.

12. *Organic pollutants adsorbed on microplastics: Analytical methodologies and occurrence in oceans*. **Santana-Viera, S. et al.** 2021, Trends in Environmental Analytical Chemistry, Vol. 29, pp. e00114-E00124. DOI: 10.1016/j.teac.2021.e00114.

13. *Endocrine disrupting chemicals (EDCs) in environmental matrices: Occurrence, fate, health impact, physio-chemical and bioremediation technology.* **Ismanto A. et al.** 2022, Environmental Pollution, Vol. 302, pp. 119061-119076. DOI: 10.1016/j.envpol.2022.119061.

14. *Microplastics and Nanoplastics in Aquatic Environments: Aggregation, Deposition, and Enhanced Contaminant Transport.* **Alimi, O.S. et al.** 2018, Environmental Science and Technology, Vol. 52, pp. 1794-1724. DOI: 10.1021/acs.est.7b05559.

ANEXO

Molécula de Bisfenol A

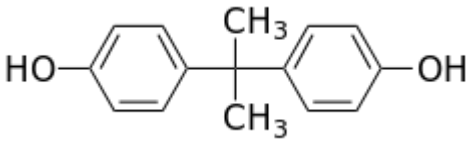


Figura 1.1. Formula estructural del Bisphenol A.

Estructura química del Bisfenol A (BPA): (4,4'-(propano-2,2-diil)-difenol

Instrumentación electroquímica y electrodos empleados

Se muestran fotos del lugar del laboratorio en donde se realizaron algunas de las medidas (Laboratorio electroquímico del Grupo de Investigación GEAS (*Grupo de Espectroscopía Analítica y Sensores, E-29_17R*) e instrumentos empleados en las medidas voltamétricas.

Figura 1.2. (A) Potenciostato µAutolab-III (Metrohm), electrodos y celda voltamétrica (caja de Faraday). (B) µAutolab-III (potenciostado).

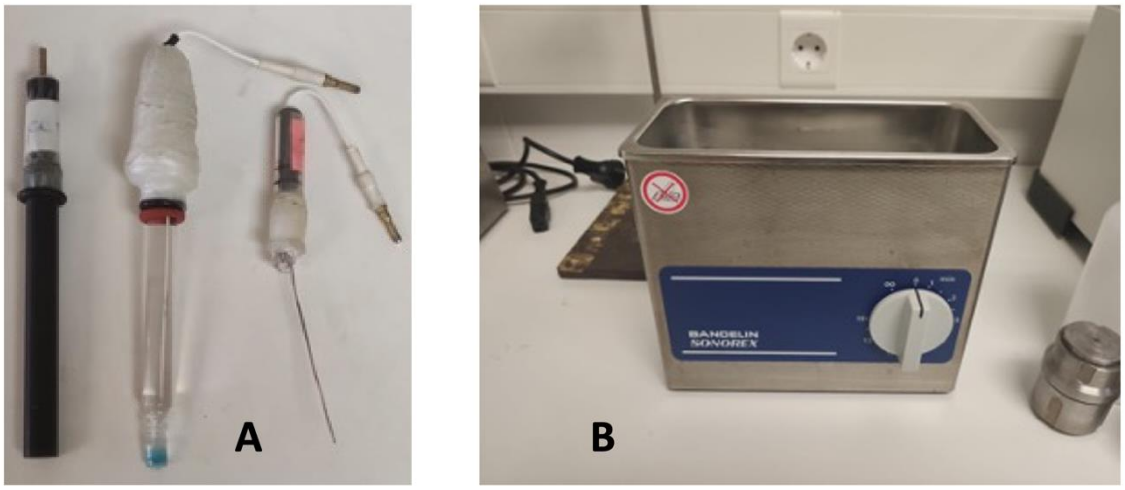


Figura 1.3. (A) Electrodos de trabajo (GCE), referencia (Ag/AgCl 3 M.) y auxiliar (hilo de Pt). (B) Baño líquido de ultrasonidos.

Voltagramas cíclicos del mediador ferrocianuro medidos al comparar electrodos GCE-*bare*, GCE-*GO* y GCE-*rGO*

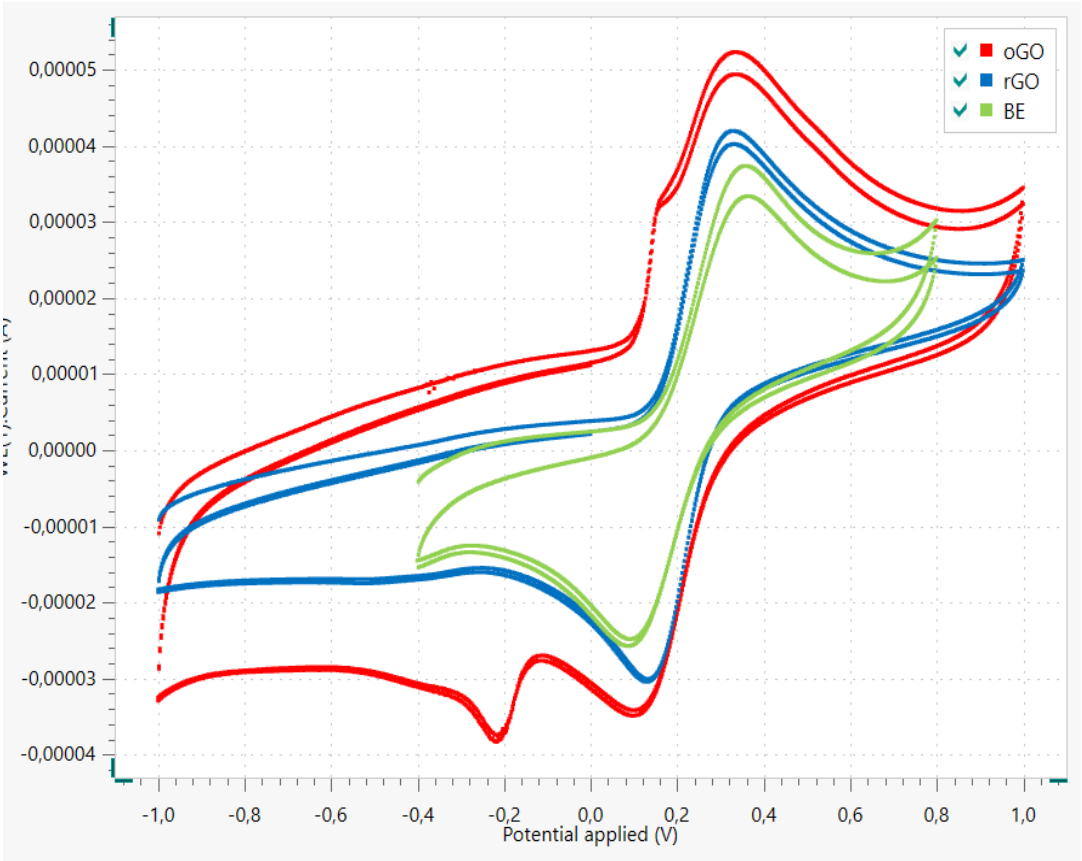


Figura 1.4. Voltagramas cíclicos de Ferrocianuro 5mM a 50mV s^{-1} con electrodos GCE-GO y GCE-rGO modificados con 3µL de Graphene oxide 0,5mg mL^{-1} y del GCE-bare.

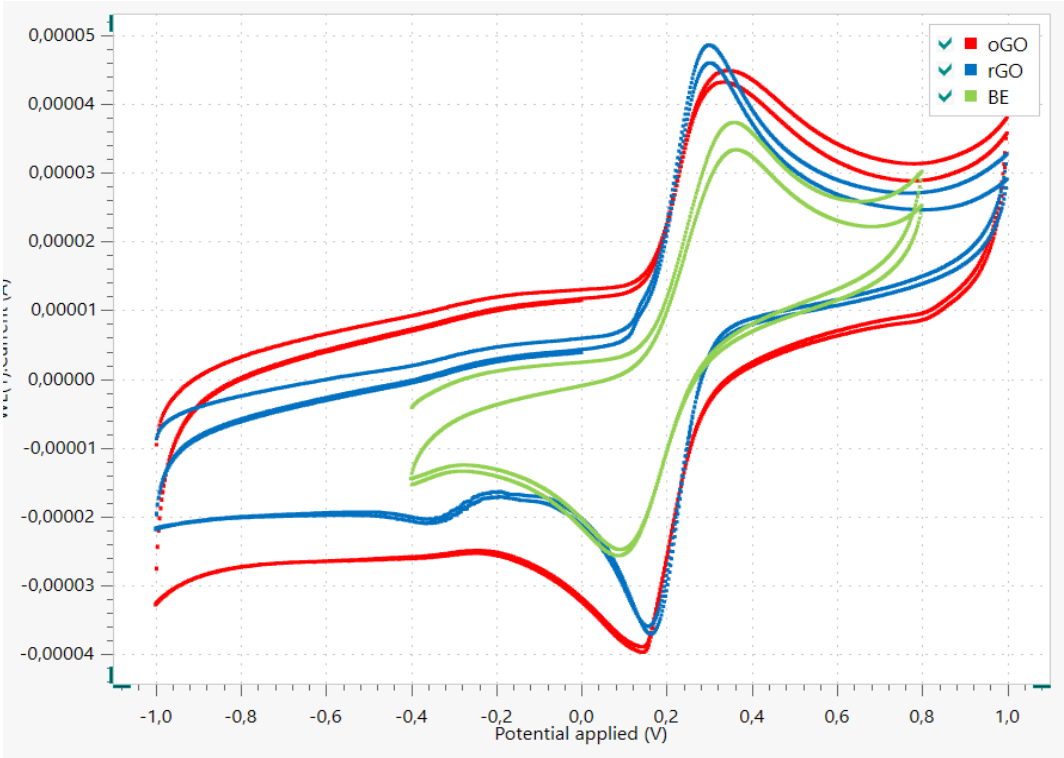


Figura 1.5. Voltagramas cíclicos de Ferrocianuro 5mM a 50mV s^{-1} con electrodos GCE-GO y GCE-rGO modificados con 5µL de Graphene oxide 0,5mg mL^{-1} y del GCE-bare.

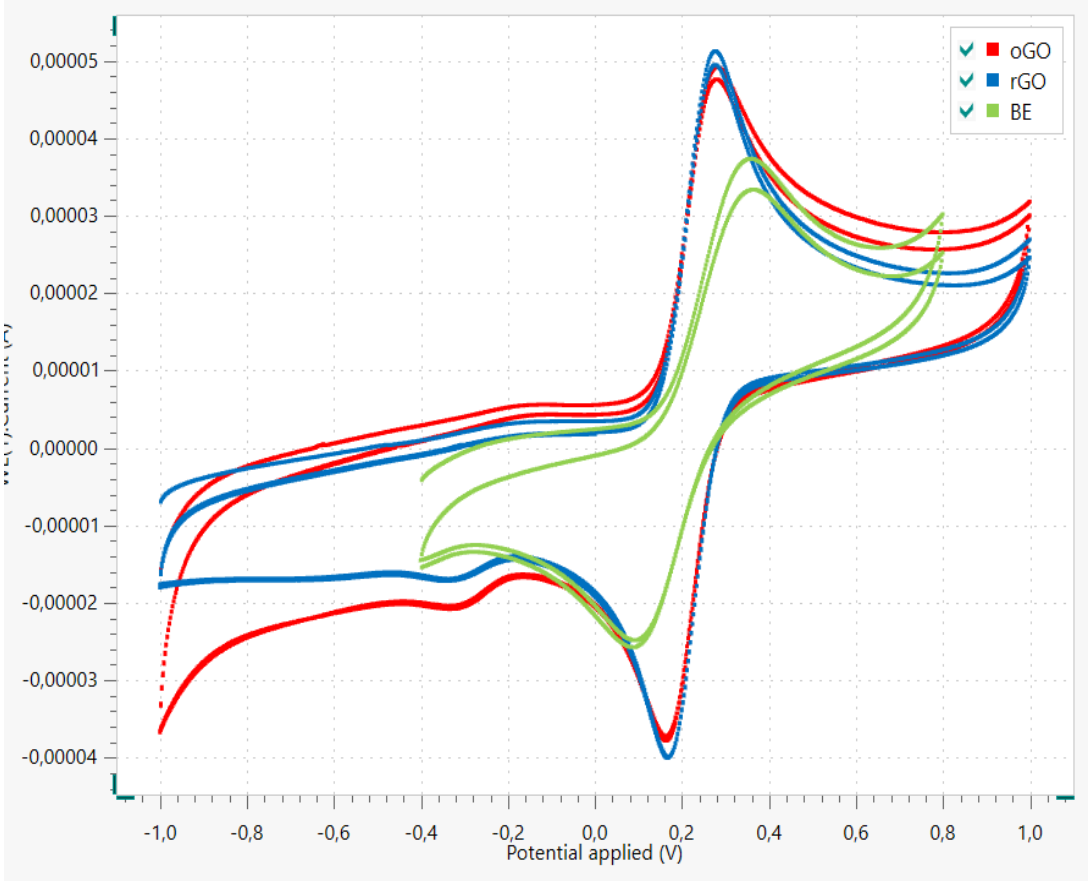


Figura 1.6 Voltagramas cíclicos de Ferrocianuro 5mM a 50mV s^{-1} con electrodos GCE-GO y GCE-rGO modificados con 10µL de Graphene oxide 1mg mL^{-1} y del GCE.

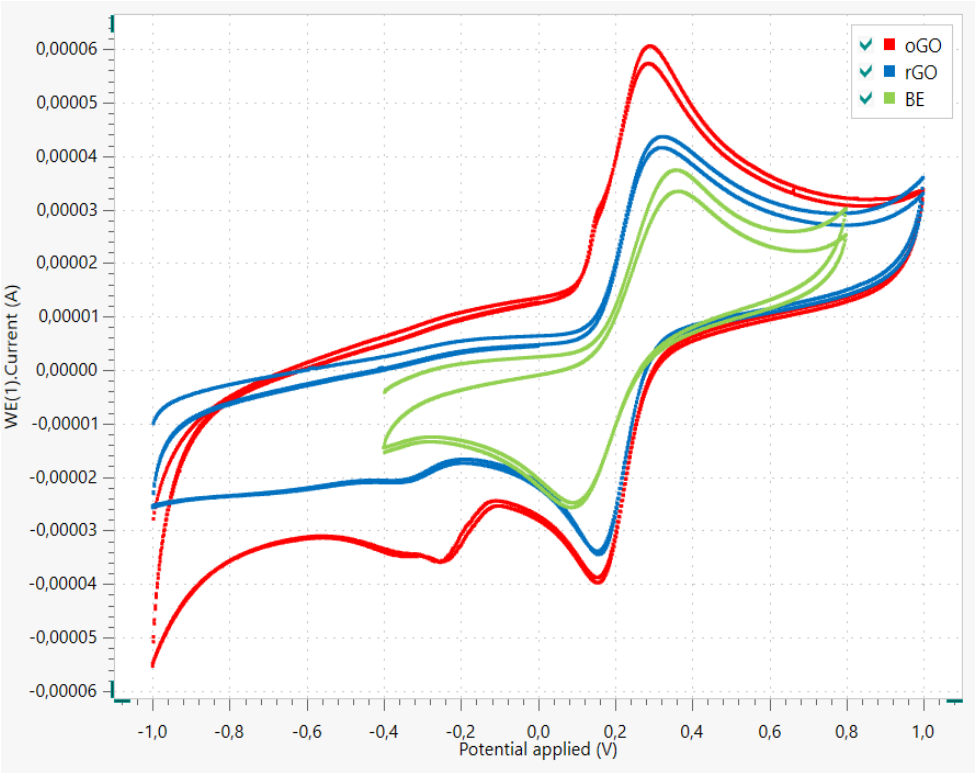


Figura 1.7. Voltagramas cíclicos de Ferrocianuro 5mM a 50mV s^{-1} con electrodos GCE-GO y GCE-rGO modificados con 15µL de Graphene oxide 0,5mg mL^{-1} y del GCE.

Voltagramas de pulso diferencial de BPA medidos al comparar electrodos GCE-*bare*, GCE-*GO* y GCE-*rGO*

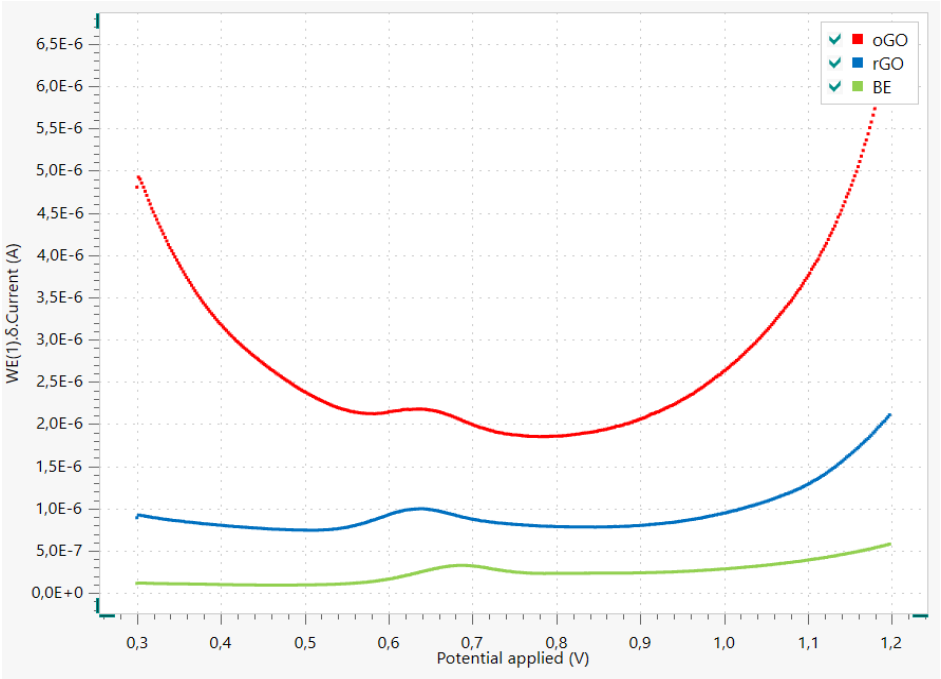


Figura 1.8. Voltagramas DPV de BPA 20µM con electrodos GCE-GO y GCE-rGO modificados con 3µL de Graphene oxide 0,5mg mL^{-1} y del GCE-bare.

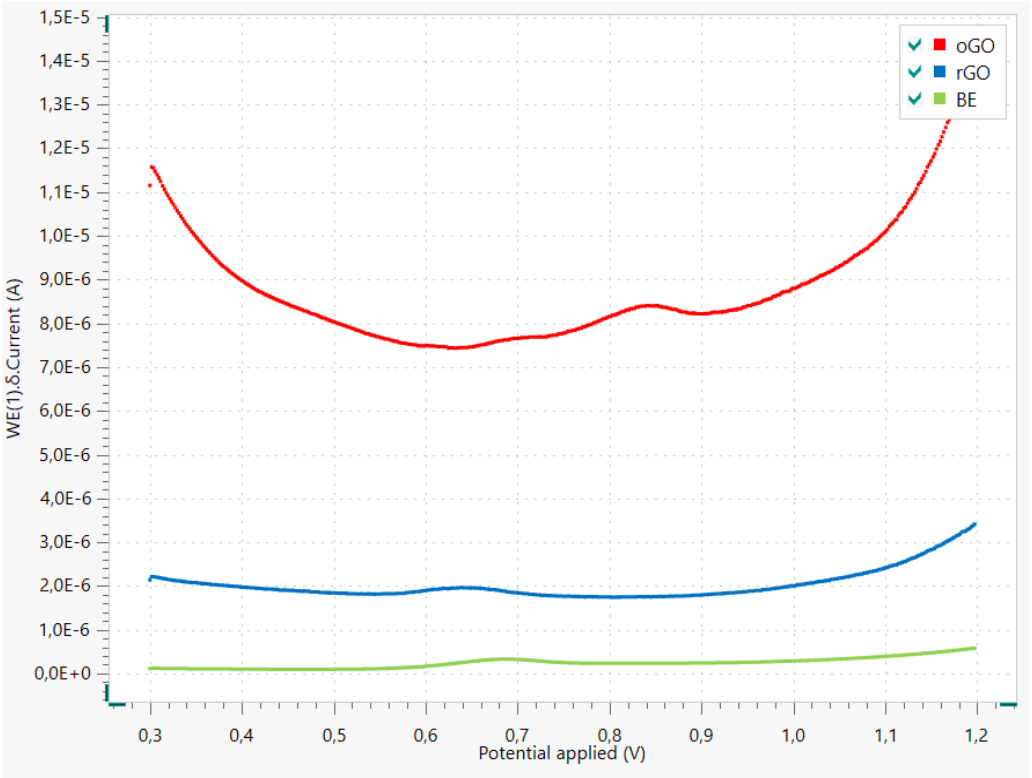


Figura 1.9. Voltagramas DPV de BPA 20µM con electrodos GCE-GO y GCE-rGO modificados con 5µL de Graphene oxide 0,5mg mL^{-1} y del GCE-bare.

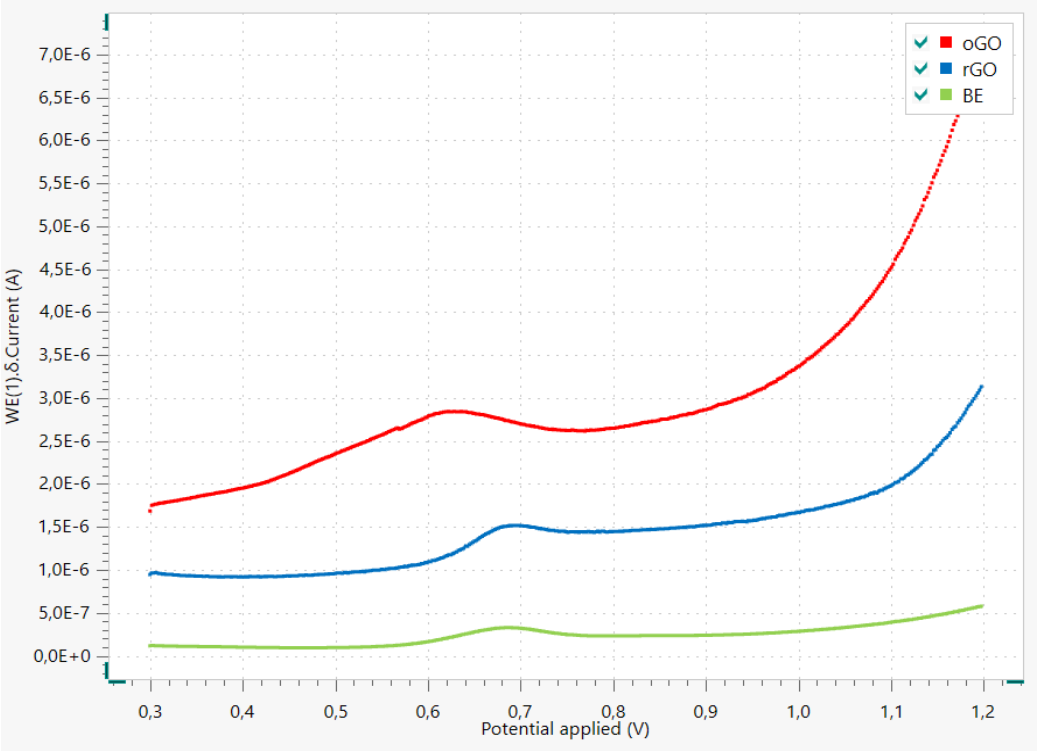


Figura 1.10. Voltagramas DPV de BPA 20µM con electrodos GCE-GO y GCE-rGO modificados con 10µL de Graphene oxide 0,5mg mL^{-1} y del GCE-bare.

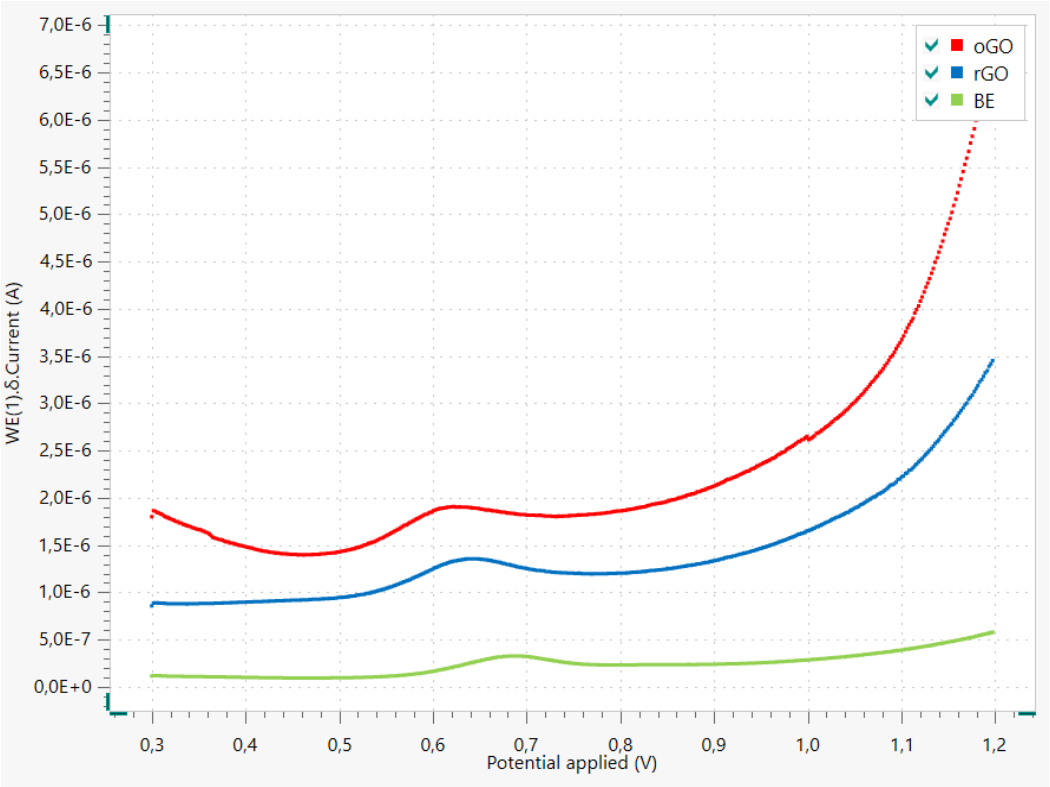


Figura 1.11. Voltagramas DPV de BPA 20µM con electrodos GCE-GO y GCE-rGO modificados con 10µL de Graphene oxide 1mg mL^{-1} y del GCE-bare.

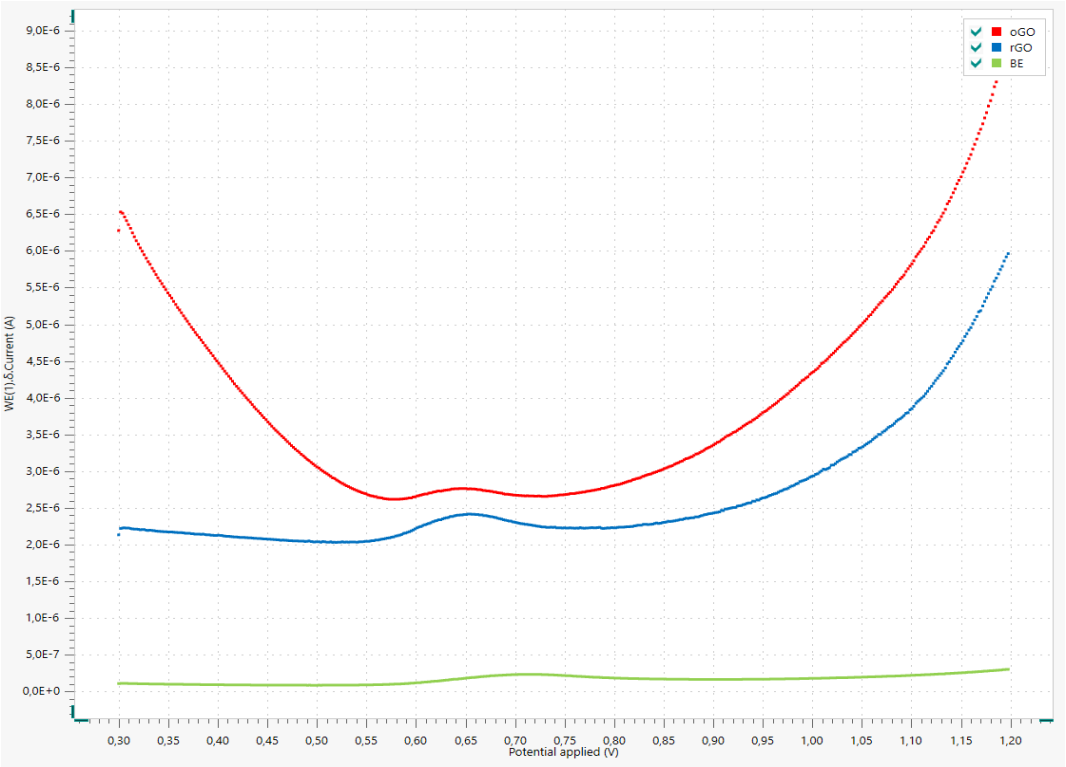
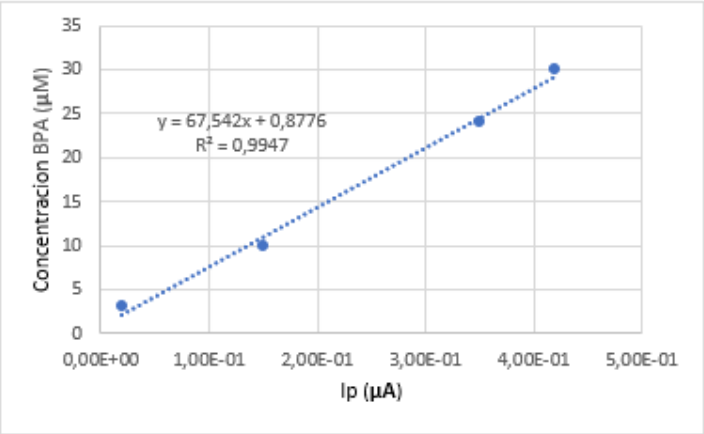


Figura 1.12. DPV de BPA 20µM de los GCE-GO y GCE-rGO modificados con 15µL de Graphene oxide 0,5mg mL^{-1} y del GCE-bare.

Curvas de calibrado de BPA con los distintos electrodos voltamétricos estudiados

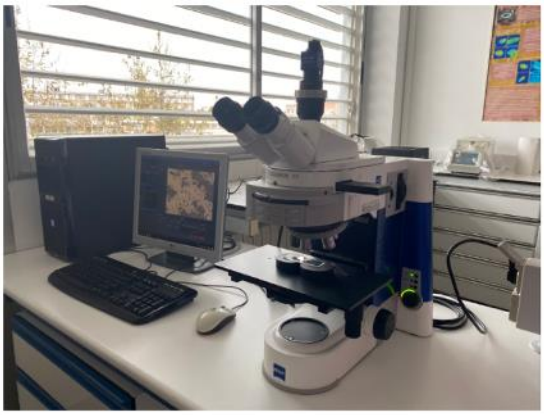


Concentracion (µM)	I_P(µA)
3	2,00E-02
10	1,50E-01
24	3,50E-01
30	4,20E-01

Figura.1.13. Curva de calibrado de BPA empleada para las medidas de BPA en disolución una vez adsorbido (parcialmente) sobre los µPs.

Instrumentación de laboratorio empleada en la obtención y procedimientos de caracterización y separación de los microplásticos

Figura 1.14. Objetos de uso cotidiano a partir de los cuáles se han obtenido los microplásticos estudiados en este TFG.



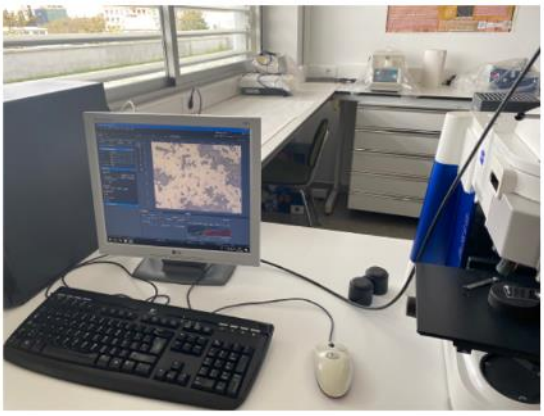


Figura 1.15. Microscopio óptico de luz reflejada Axio Imager (Carl Zeiss) con luz polarizada empleado en la caracterización del tamaño de los microplásticos.

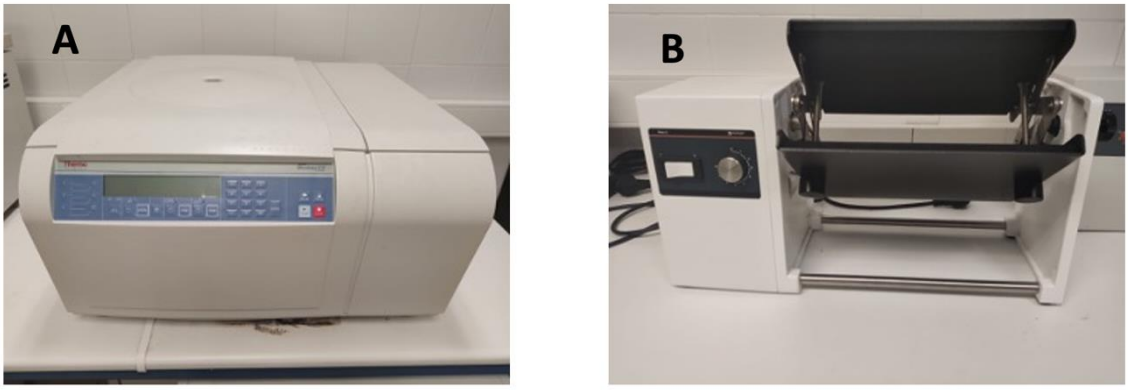


Figura 1.16. (A) Centrifugadora Heraeus Multifuge X1R, empleada en la separación de las disoluciones de BPA de las micropartículas sólidas de los µPs. (B) y Agitador orbital Reax 02, empleado en modo volteo para la agitación vertical de los tubos de plástico conteniendo las dispersiones de los µPs (con distintos contenidos mg mL^{-1}) y una concentración constante de 8 mM BPA.

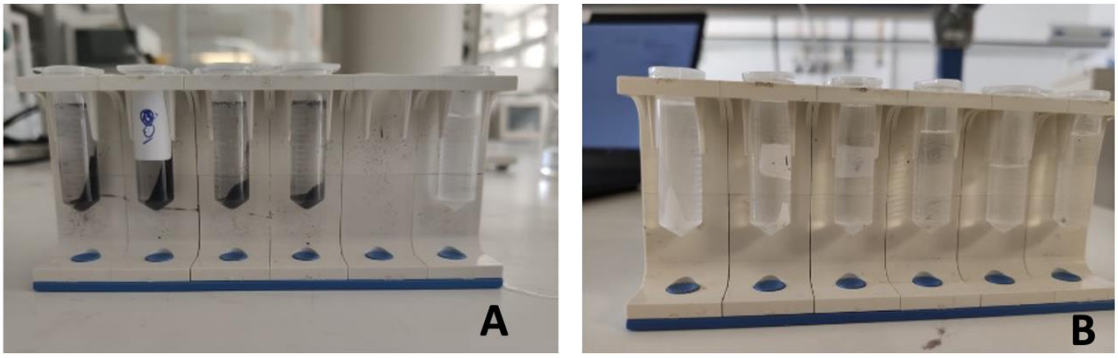


Figura 1.17. Tubos con disoluciones 8 mM BPA con dispersiones de (A) EPS-µPs y (B) PS-µPs después de su separación por centrifugación.

Microfotografías empleadas para medir distribuciones de tamaño de µPs

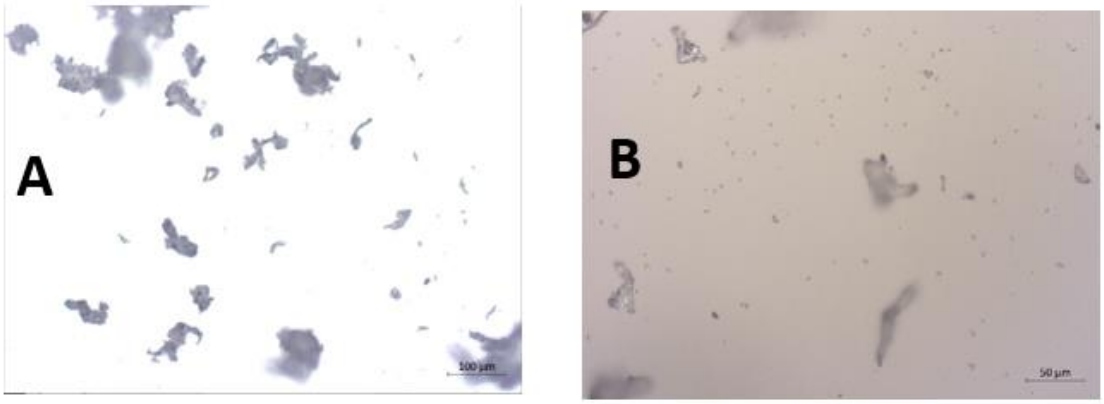


Figura 1.18. Microfotografías de EPS-µPs en aumentos de (A) x50) y (B) x200.

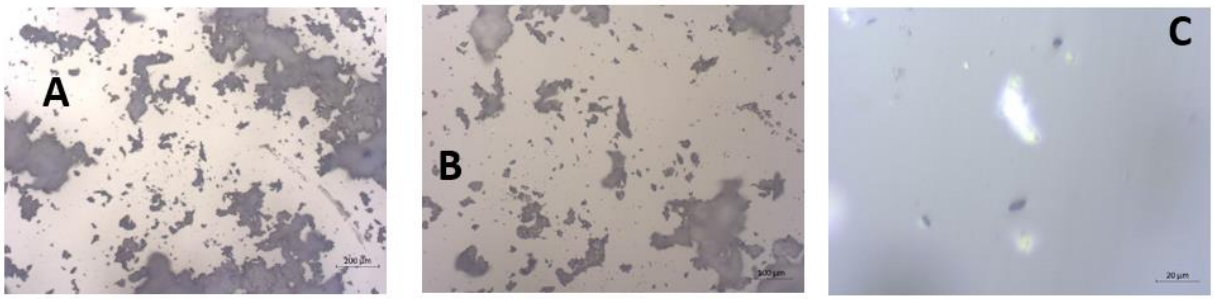


Figura 1.19. Microfotografías de PS-µPs en aumentos de (A) x50, (B), x100) y (C) x500.

Abreviaturas empleadas en esta memoria

Abreviatura	**Significado**
µPs	Microplásticos
BPA	Bisfenol A (*bisphenol A*)
CV	Voltametría cíclica (*cyclic voltammetry*)
DPV	Voltametría de pulso diferencial (*differential pulse voltammetry*)
E_p	Potencial máximo del pico voltamétrico DPV del BPA.
EPS	Poliestireno expandido (*expanded polystyrene*)
EPS-µPs	Micropartículas de poliestireno expandido.
ET	Electrodo voltamétrico de trabajo
GCE	Electrodo de carbón vítreo (*glassy carbon electrode*)
GO	Óxido de grafeno (*graphene oxyde*)
I_p	Corriente del máximo del pico voltamétrico (voltagramas de BPA)
mtc	Medidor de transferencia de carga (*charge-transfer mediator)*
ppb	Partes por billón
ppm	Partes por millón
ppt	Partes por trillón
PS	Poliestireno (*polystyrene*)
PS-µPs	Micropartículas de poliestireno

Listado de Figs. empleadas en esta memoria TFG

Figura 0.1. Valores de Ip de los picos voltamétricos anódicos medidos en función de la vbp por voltametría cíclica. Disoluciones de ferrocianuro 5mM en KCl 0,10 M. Relación lineal de Ip frente a la raíz cuadrada de la vbp. 14
Figura 0.2. Voltagramas DPV de una disolución BPA 20µM empleando electrodos GCE-GO y GCE-rGO modificados con 10 µL de graphene oxide (0,5mg mL-1) y GCE-bare sin modificar. 16
Figura 0.3. Voltagramas cíclicos de Ferrocianuro 5mM a 50mV s-1 con los electrodos de trabajo (A) GCE-GO y (B) GCE-rGO modificados con 10µL de Graphene oxide 0,5mg mL-1; y (C) con electrodo de trabajo GCE-bare 17
Figura 0.4. Representación de la altura de los picos en la primera y segunda medida con el transcurso del tiempo. Cuantificación del BPA en las mismas condiciones que las de la tabla 5. Mejora de la reproducibilidad trabajando sin regeneración y con la regeneración electroquímica del GCE-GO. 19
Figura 0.5. Voltagramas DPV tipicos de BPA 50µM en disolución: (A) antes y (B) después del pulido del electrodo GCE-bare. 20
Figura 0.6. Micropartículas de poliestireno expandido (EPS-µPs), tomadas con un aumento x100. 21
Figura 0.7. Micropartículas de poliestireno (PS-µPs) obtenidas con un aumento x200. 22
Figura 0.8. Ajustes de modelización del %EA en función del tiempo para la adsorción de BPA 8 mM sobre PS-µPs 0,4 mg mL^{-1}. 24
Figura 0.9. Ajustes de modelización del %EA en función del tiempo para la adsorción de BPA 8 mM sobre PS-µPs 1,6 mg mL^{-1}. 25
Figura 0.10. Ajustes de modelización del %EA en función del tiempo para la adsorción de BPA 8 mM sobre EPS-µPs 0,4 mg mL^{-1}. 25
Figura 0.11. Ajustes de modelización del %EA en función del tiempo para la adsorción de BPA 8 mM sobre EPS-µPs 1,6 mg mL^{-1}. 25
Figura 1.1. Formula estructural del Bisphenol A. 30
Figura 1.2. (A) Potenciostato µAutolab-III (Metrohm), electrodos y celda voltamétrica (caja de Faraday). (B) µAutolab-III (potenciostado). 30
Figura 1.3. (A) Electrodos de trabajo (GCE), referencia (Ag/AgCl 3 M.) y auxiliar (hilo de Pt). (B) Baño líquido de ultrasonidos. 31
Figura 1.4. Voltagramas cíclicos de Ferrocianuro 5mM a 50mV s-1 con electrodos GCE-GO y GCE-rGO modificados con 3µL de Graphene oxide 0,5mg mL-1 y del GCE-bare. 31
Figura 1.5. Voltagramas cíclicos de Ferrocianuro 5mM a 50mV s-1 con electrodos GCE-GO y GCE-rGO modificados con 5µL de Graphene oxide 0,5mg mL-1 y del GCE-bare. 32
Figura 1.6. Voltagramas cíclicos de Ferrocianuro 5mM a 50mV s-1 con electrodos GCE-GO y GCE-rGO modificados con 10µL de Graphene oxide 1mg mL-1 y del GCE. 32
Figura 1.7. Voltagramas cíclicos de Ferrocianuro 5mM a 50mV s-1 con electrodos GCE-GO y GCE-rGO modificados con 15µL de Graphene oxide 0,5mg mL-1 y del GCE. 33
Figura 1.8. Voltagramas DPV de BPA 20µM con electrodos GCE-GO y GCE-rGO modificados con 3µL de Graphene oxide 0,5mg mL-1 y del GCE-bare. 33
Figura 1.9. Voltagramas DPV de BPA 20µM con electrodos GCE-GO y GCE-rGO modificados con 5µL de Graphene oxide 0,5mg mL-1 y del GCE-bare. 34
Figura 1.10. Voltagramas DPV de BPA 20µM con electrodos GCE-GO y GCE-rGO modificados con 10µL de Graphene oxide 0,5mg mL-1 y del GCE-bare. 34

Figura 1.11. Voltagramas DPV de BPA 20µM con electrodos GCE-GO y GCE-rGO modificados con 10µL de Graphene oxide 1mg mL-1 y del GCE-bare 35
Figura 1.12. DPV de BPA 20µM de los GCE-GO y GCE-rGO modificados con 15µL de Graphene oxide 0,5mg mL-1 y del GCE-bare. 35
Figura 1.13. C Curva de calibrado de BPA empleada para las medidas de BPA en disolución una vez adsorbido (parcialmente) sobre los µPs. 36
Figura 1.14. Objetos de uso cotidiano a partir de los cuáles se han obtenido los microplásticos estudiados en este TFG. 36
Figura 1.15. Microscopio óptico de luz reflejada Axio Imager (Carl Zeiss) con luz polarizada empleado en la caracterización del tamaño de los microplásticos. 36
Figura 1.16. (A) Centrifugadora Heraeus Multifuge X1R, empleada en la separación de las disoluciones de BPA de las micropartículas sólidas de los µPs. (B) y Agitador orbital Reax 02, empleado en modo volteo para la agitación vertical de los tubos de plástico conteniendo las dispersiones de los µPs (con distintos contenidos mg mL^{-1}) y una concentración constante de 8 mM BPA. 37
Figura 1.17. Tubos con disoluciones 8 mM BPA con dispersiones de (A) EPS-µPs y (B) PS-µPs después de su separación por centrifugación. 37
Figura 1.18. Microfotografías de EPS-µPs en aumentos de (A) x50) y (B) x200. 37
Figura 1.19. Microfotografías de PS-µPs en aumentos de (A) x50, (B), x100) y (C) x500. 38

Listado de Tablas empleadas en la memoria de TFG

Tabla 0.1. Volúmenes y concentraciones de graphene oxide añadidos a los electrodos GCE-bare para su nanoestructuración física, obteniendo electrodos GCE-GO. 15
Tabla 0.2. Volúmenes y concentraciones de las dispersiones de graphene oxide añadidos a los electrodos GCE-bare para su nanoestrcuturación posterior, obteniendo electrodos modificados GCE-rGO. 15
Tabla 0.3. Altura de pico de medidas voltamétricas DPV repetidas de disoluciones 20µM de BPA, empleando los electrodos GCE modificados (GO, rGO) y sin modificar (bare). 15
Tabla 0.4 Valores de Ip y ΔEp de voltagramas cíclicos en disoluciones 5mM de ferrocianuro con los 3 tipos de electrodos estudiados. 17
Tabla 0.5. Valores Ip de la primera y segunda medida DPV diaria de BPA 20µM, en días sucesivos, con el electrodo GCE-GO modificado con 10µL de GO 0,5mg mL-1. 18
Tabla 0.6. Alturas máximas de pico(Ip) antes y después del pulido realizado después de medidas DPVs de BPA 50 y 100uM BPA, empleando electrodos GCE-bare. 19
Tabla 0.7. Capacidad de retención (mg BPA g-1 µP) del BPA en función de distintas cantidades de µPs, para un tiempo de equilibrio de adsorción de 24 h. 26