



Universidad
Zaragoza

Trabajo Fin de Grado

Desarrollo de métodos analíticos para la caracterización
y cuantificación de microplásticos mediante análisis
dinámico de imágenes

Development of analytical methods for the
characterisation and quantification of microplastics by
dynamic image analysis

Autor

Inés Lázaro Fernández

Director

Francisco Laborda García

Facultad de Ciencias
Departamento de Química Analítica
2024

RESUMEN

La presencia de microplásticos y nanoplásticos en los ecosistemas acuáticos, terrestres y atmosféricos provoca preocupaciones significativas para el medio ambiente y la salud humana. Estas partículas pueden ser originadas a partir de la degradación de otros materiales plásticos o por la liberación directa.

Comprender el impacto medioambiental de los microplásticos se ha convertido en una prioridad crucial para la conservación de los ecosistemas y la protección de la salud pública. Por ello, es esencial desarrollar técnicas analíticas que permitan su identificación y cuantificación correctamente. Destaca la técnica de análisis dinámico de imágenes, una técnica sencilla que permite llevar a cabo un estudio tanto cualitativo como cuantitativo: evaluar la morfología y la concentración en número de micropartículas contenido en las muestras.

La disponibilidad de patrones de microplásticos es fundamental para el desarrollo de métodos que permitan su determinación en distintos tipos de muestras. Dado que en la práctica estos patrones están restringidos a partículas de poliestireno de distintos diámetros y características superficiales, en este trabajo se ha propuesto la preparación y caracterización de suspensiones de micropartículas de cloruro de polivinilo (PVC) y de tereftalato de polietileno (PET) a partir de los correspondientes plásticos molidos.

ABSTRACT

The presence of microplastics and nanoplastics in aquatic, terrestrial and atmospheric ecosystems causes significant environmental and human health concerns. These particles can originate from the degradation of other plastic materials or from direct release.

Understanding the environmental impact of microplastics has become a crucial priority for the conservation of ecosystems and the protection of public health. It is therefore essential to develop analytical techniques that allow their correct identification and quantification. The dynamic image analysis technique is a simple technique that allows both a qualitative and quantitative study to be carried out: assessing the morphology and the concentration in number of microparticles contained in the samples.

The availability of microplastic standards is essential for the development of methods that allow their determination in different types of samples. Given that in practice these standards are restricted to polystyrene particles of different diameters and surface characteristics, this work has proposed the preparation and characterisation of polyvinyl chloride (PVC) and polyethylene terephthalate (PET) micro-particle suspensions from the corresponding ground plastics.

ÍNDICE

1. INTRODUCCIÓN.....	1
1.1. Técnicas de separación de microplásticos	2
1.2. Técnicas analíticas para la detección y cuantificación de microplásticos.	3
1.3. Análisis dinámico de imágenes	5
2. OBJETIVOS Y PLANTEAMIENTO.....	6
3. PARTE EXPERIMENTAL	7
3.1. Instrumentación.....	7
3.2. Patrones	7
3.3. Muestras	7
3.4. Procedimientos.....	7
3.4.1. Análisis con DIA	7
3.4.2. Análisis de suspensiones de microplásticos	7
4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	8
4.1. Parámetros básicos en análisis dinámico de imágenes (DIA).....	8
4.2. Determinación del tamaño de partícula mediante DIA	9
4.2.1. Optimización de parámetros.....	9
4.2.2. Validación del método	10
4.3. Determinación de la concentración en número de partículas mediante DIA	12
4.3.1. Optimización de parámetros.....	12
4.3.2. Calibración	13
4.3.3. Validación del método	14
4.4. Análisis directo de suspensiones de microplásticos	16
4.4.1. Parámetros básicos para el análisis de suspensiones de microplásticos	18
4.4.2. Análisis de suspensiones de microplásticos de PVC.....	19
4.4.3. Análisis de suspensiones de microplásticos de PET.....	20
5.CONCLUSIONES.....	22
BIBLIOGRAFÍA.....	23
ANEXOS	25

1. INTRODUCCIÓN

El problema de los desechos plásticos es una preocupación ambiental mundial que está creciendo a un ritmo alarmante. Solo aproximadamente el 9% de los plásticos se reciclan, mientras que el resto terminan en vertederos, se incineran o se desechan como residuo en la naturaleza. Para el año 2050, se prevé que la cantidad de residuos plásticos acumulados en los vertederos podría alcanzar los 12 mil millones de toneladas, lo que contrasta con los 5 mil millones de toneladas de residuos plásticos generados en 2015.¹

Los plásticos tienen una gran durabilidad, pero pueden degradarse mediante una variedad de mecanismos, que pueden ser el resultado de diversos factores ambientales, como son la exposición a la radiación solar, la acción del viento, del agua, de microorganismos, incluso las condiciones físicas y químicas del medio ambiente. Debido a estos procesos de degradación, se forman partículas más pequeñas conocidas como microplásticos y nanoplásticos.

Los microplásticos son materiales plásticos con un tamaño que no supera los 5 milímetros, lo cual los convierte en un problema para el medioambiente debido a que, por su tamaño, son fácilmente ingeridos por organismos interfiriendo en sus funciones vitales dada su toxicidad. Por otro lado, existe controversia en cuanto a la definición de nanoplásticos. Según la Comisión Europea, la definición que ofreció en 2022 establece que cualquier partícula de plástico con un tamaño entre 1 nm y 100 nm será considerada nanoplástico.²

Dentro de los microplásticos, se diferencian dos grupos: aquellos denominados como microplásticos primarios, que son los que se fabrican directamente para un uso concreto y, por tanto, llegan al medio ambiente tal y como han sido fabricados, algunos ejemplos serían aquellos utilizados en campos deportivos con hierba artificial, microbolas en exfoliantes, cosméticos, ... Por otro lado, están los microplásticos secundarios, que son aquellos que se generan tras la degradación de otros materiales plásticos.³

Los microplásticos sirven como vectores de contaminantes debido a su gran capacidad de movilidad, su superficie hidrofóbica y la elevada superficie específica, son capaces de acumular diversos contaminantes, como pueden ser hidrocarburos aromáticos policíclicos o metales pesados.³ Debido a ello, tienen diversas repercusiones sobre los ecosistemas, como puede ser la alteración de la biodiversidad, el aumento de bacterias patógenas o incluso reducir la calidad del agua, entre otras. No sólo se encuentran microplásticos en medios acuáticos, sino que también se ha observado la presencia de éstos en ambientes terrestres y aéreos.⁴

Existen medidas preventivas para eliminar los microplásticos del medio ambiente debido a sus efectos nocivos. Algunos de los métodos que se proponen es una degradación llevada a cabo por microorganismos, es decir, hay microorganismos que son capaces de romper los enlaces que unen las cadenas poliméricas permitiendo así descomponerlos en fragmentos más pequeños. Otro de los procesos empleados son la utilización de oxidantes químicos o el uso de temperaturas elevadas para obtener componentes más simples. No obstante, es fundamental que este problema sea abordado en su punto de origen, es decir, reduciendo la producción de microplásticos.³

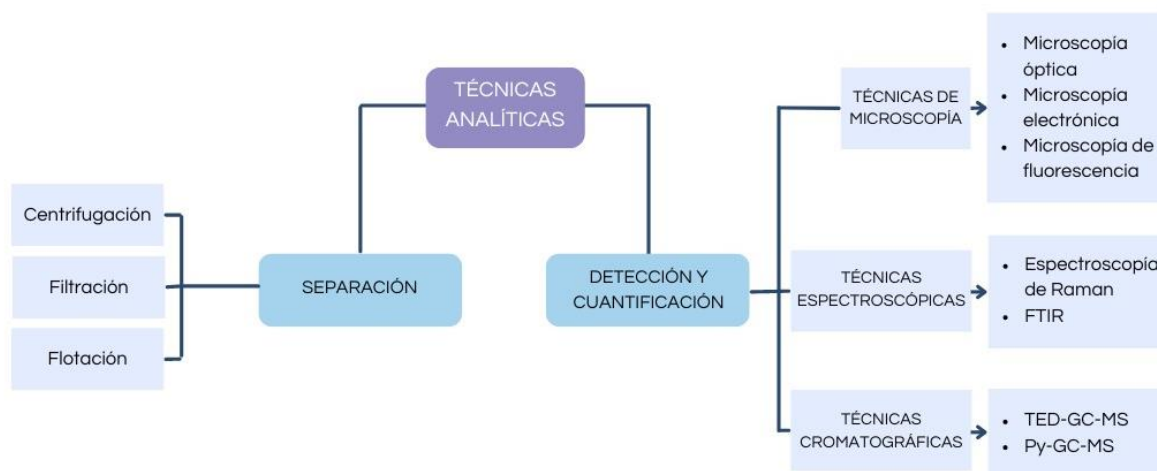


Figura 1. Esquema de las principales técnicas para la separación, detección y cuantificación de microplásticos

1.1. TÉCNICAS DE SEPARACIÓN DE MICROPLÁSTICOS

Tanto la centrifugación como la filtración y la flotación son técnicas eficaces para la separación de microplásticos en muestras líquidas, y su elección depende de las características de las muestras. Además, esta etapa de separación también puede considerarse como una etapa de preconcentración.

- **Centrifugación**

Se basa en la aplicación de una fuerza centrífuga para separar partículas por su tamaño y/o densidad en una muestra líquida. Los microplásticos de mayor densidad y tamaño se acumularán en el fondo del tubo de centrifugación; mientras que los menos densos y menores quedarán en suspensión. Hay varios parámetros que hay que tener en cuenta, como son la velocidad, la duración y la longitud del tubo, por lo que con las condiciones adecuadas se podrá hacer una separación eficaz para plásticos con mayor densidad que el medio de suspensión.⁵

- **Filtración**

Se basa en el paso de una muestra líquida a través de un filtro con un tamaño de poro específicos. Los microplásticos con un tamaño superior al tamaño de poro quedan retenidos en el filtro; mientras que el líquido y microplásticos con un tamaño inferior al del poro pasarán a través del filtro. Por tanto, la elección del tamaño de poro es un parámetro importante.

- **Flotación**

Se basa en la separación de partículas en base a su densidad, es por ello que se emplean electrolitos inertes (NaCl, ZnCl₂, CaCl₂) que permiten ajustar la densidad del medio a un valor específico mayor que la de los microplásticos a separar, de manera que los microplásticos flotarán, permitiendo una separación eficiente de partículas inorgánicas de mayor densidad. Aunque la solución más empleada para la separación por densidad es una disolución saturada de NaCl, ésta tiene una densidad de 1,2 g/cm³, lo que dificulta la separación de los microplásticos de mayor densidad; por ello, se están empleando otros electrolitos como son el ZnCl₂ o CaCl₂.⁶ El principio de la flotación también se apoya en el uso de burbujas de gas, las cuales capturan selectivamente las partículas hidrófobas y las transportan a la superficie del líquido, formando una zona de espuma, pudiendo ser separadas de las partículas hidrófilas.⁷

1.2. TÉCNICAS ANALÍTICAS PARA LA DETECCIÓN Y CUANTIFICACIÓN DE MICROPLÁSTICOS.

Debido a los problemas ocasionados por los microplásticos tanto en el medio ambiente como en la flora y la fauna, se han ido aplicando diversas técnicas analíticas para la detección y cuantificación de estos plásticos, que con el tiempo han ido evolucionando, aunque todavía hoy en día no hay una técnica que permita detectar y cuantificar adecuadamente todos los microplásticos, por lo que se usa combinaciones de varias técnicas.

Las técnicas analíticas utilizadas se pueden clasificar en tres grupos: técnicas de microscopía, técnicas espectroscópicas y técnicas cromatográficas.³

▪ Técnicas de microscopía

Son aquellas basadas en el uso de diferentes tipos de microscopios mediante los cuales se permite observar muestras que no son visibles al ojo humano. Estas técnicas describen la morfología de la partícula, tanto su forma como su tamaño. La preparación previa de la muestra es importante para obtener imágenes de alta calidad y consiste en su separación por filtración, observando las partículas retenidas en el filtro. Dentro de este grupo se incluye:

- *Microscopía óptica*

Permite la observación directa de la muestra bajo un microscopio óptico. Utiliza la luz visible para iluminar la muestra y una lente a través de la cual el analista observa la muestra con varios aumentos. Tiene la limitación de que no es capaz de detectar partículas muy pequeñas, inferiores a 3 μm .⁸

Como ventaja tiene el fácil manejo y no es una técnica destructiva; y tiene el inconveniente de que no proporciona información química sobre la muestra y tiene limitado el tamaño de partícula que se puede llegar a detectar.

- *Microscopía electrónica*

Dentro de estas técnicas, destaca la microscopía electrónica de barrido (SEM) y la microscopía electrónica de transmisión (TEM). La microscopía electrónica de barrido utiliza electrones para formar una imagen de la superficie de la muestra: un haz de electrones de alta energía emitidos por un cátodo interactúa con la muestra, produciendo varias señales, que se recogen y permiten obtener imágenes topográficas de alta resolución. En este caso, se pueden detectar partículas a partir de 1-10 nm y es frecuente combinarla con otras técnicas para completar la caracterización de las partículas.³ La microscopía electrónica de transmisión también utiliza un haz de electrones de alta resolución, pero en este caso, los electrones que interactúan con la muestra son dispersados, siendo los electrones transmitidos los que forman una imagen que se amplifica. Tiene una mayor resolución que SEM, ya que permite alcanzar resoluciones de menos de 1 nm.

Como ventaja presentan la alta resolución de imagen, además de proporcionar información elemental mediante técnicas complementarias como la espectroscopía de energía dispersiva de rayos X (EDX), y tiene la desventaja de que la muestra puede ser dañada por el haz de electrones, así como el coste de la técnica.

- *Microscopía de fluorescencia.*

Se basa en la visualización de la emisión fluorescente de los microplásticos a partir de su excitación con radiación de la zona UV-visible de longitud de onda adecuada. Es necesaria la utilización de marcadores fluorescentes, por lo que no permite el análisis directo. Uno de los marcadores fluorescentes más empleado es el Rojo Nilo, que es un

colorante solvatocrómico, es decir, su espectro de emisión depende de la polaridad del material que rodea a las moléculas de Rojo Nilo (cuanto más polar, el espectro se desplaza hacia longitudes más cortas).^{9,10}

▪ **Técnicas espectroscópicas combinadas con microscopía**

Se trata de técnicas analíticas no destructivas y no necesitan grandes cantidades de muestra; sin embargo, a pesar de que las medidas puntuales son instantáneas, requieren un tiempo prolongado para analizar el filtro en el que se han retenido los microplásticos.¹¹

- *Microespectroscopía infrarroja por transformada de Fourier (FTIR)*

Es una de las técnicas más empleadas para la detección de microplásticos, donde el espectrofotómetro FTIR se combina con un microscopio óptico. Consiste en la irradiación de la muestra con radiación infrarroja, la cual interactúa con las moléculas provocando cambios en los modos vibracionales. Gracias al microscopio se examina visualmente la muestra y se seleccionan las partículas de interés. Algunas longitudes de onda son absorbidas por las moléculas mientras que otras son transmitidas, es esta luz transmitida la que se detecta. Posteriormente esta señal sufre una transformación de Fourier que convierte la señal en un espectro infrarrojo que indica la intensidad de absorción en función de la longitud de onda.^{10,12,13}

En este caso, tiene la ventaja de proporcionar información sobre grupos funcionales y estructura molecular; sin embargo, requiere una preparación previa de la muestra y es sensible a agua y otros solventes por lo que las muestras deben estar perfectamente secas.

- *Microespectroscopía Raman*

Se trata de la combinación de la espectroscopía Raman con la microscopía óptica confocal, permitiendo vincular, como en el caso anterior, la información espectral con la información espacial. La espectroscopía Raman es una técnica espectroscópica vibracional en la que la muestra es irradiada con un rayo láser y se genera un espectro distinto para cada polímero debido a las diferencias en la dispersión inelástica de la luz, ya que cada molécula química tiene diferentes modos de vibración. Cuando la luz incide sobre la muestra, parte de ella es dispersada sin cambio en su energía (dispersión Rayleigh); mientras que otra parte experimenta cambios en su energía debido a la interacción con las vibraciones de las moléculas de la muestra (dispersión Raman).^{3,9,10}

Una de las ventajas que presenta es la conservación de la muestra después del análisis y una mayor resolución (permite observar partículas de hasta 1 μm), sin embargo, la muestra no debe presentar fluorescencia o absorbancia a la longitud de onda de excitación.¹⁴

▪ **Técnicas cromatográficas**

Este tipo de técnicas tienen un enfoque distinto ya que se basan en la identificación de los polímeros mediante el análisis de sus productos de degradación al someterlos a temperaturas elevadas, son técnicas destructivas. Los tratamientos térmicos en combinación con la separación cromatográfica permiten la identificación de los polímeros y su cuantificación en masa, sin embargo, no proporcionan información morfológica.¹¹

- *Pirólisis acoplada a cromatografía de gases con espectrometría de masas (Pyr-GC-MS)*

La cromatografía de gases junto con la espectroscopía de masas permite identificar y cuantificar especies orgánicas volátiles. Si se acopla junto con pirólisis, la muestra se degrada térmicamente a 600-1000°C en un horno isotérmico con atmósfera inerte, de

manera que aquellos polímeros grandes con enlaces débiles se descomponen en fragmentos más pequeños y, por tanto, más volátiles, los cuales serán separados en la cromatografía de gases y detectados en el espectrofotómetro de masas.

Con esta técnica se obtiene un análisis más completo ya que cada polímero tiene productos de degradación característicos. Tiene la ventaja de que la muestra no requiere un tratamiento previo y además no depende de la forma y tamaño de los microplásticos. Sin embargo, presenta algunas limitaciones, como la generación de compuestos intermedios o la falta de información sobre el tamaño de las partículas.^{10,11}

- *Extracción térmica y desorción con cromatografía de gases - espectrometría de masas (TED-GC-MS)*

Se trata de un procedimiento de dos pasos que combina el analizador termogravimétrico (TGA) y el GC-MS de desorción térmica para detectar y determinar polímeros. Inicialmente, la muestra se piroliza con un flujo suave de nitrógeno en un TGA a temperaturas elevadas (hasta 1000°C) y los subproductos se recogen sobre un adsorbente en fase sólida. Posteriormente, estos subproductos se desorben, se separan y se detectan individualmente mediante GC-MS.

Se trata de uno de los métodos más adecuados para muestras ambientales complejas con matriz desconocida y tipos de microplásticos desconocidos y variables. Además, apenas requiere una preparación de la muestra, es rápido y puede procesar grandes cantidades de muestras; sin embargo, el usuario requiere amplios conocimientos para su manejo.¹⁵

Además de estas técnicas convencionales empleadas para la detección y cuantificación de microplásticos, cabe mencionar otra técnica avanzada: *Espectrometría de masas con plasma de acoplamiento inductivo en modo de detección de partículas individuales (SP-ICP-MS)*.

Se trata de una técnica en la que se introduce una suspensión de partículas muy diluida, con el objetivo de que únicamente entre en el plasma una partícula dentro del tiempo de respuesta del instrumento. De este modo, partículas individuales se descomponen e ionizan mediante el plasma de alta temperatura, y posteriormente se detecta en el espectrómetro de masas el carbono. Permite detectar partículas de plástico de hasta 1µm y concentraciones de 100 partículas por mililitro. Sin embargo, la determinación de carbono se ve dificultada por su alto potencial de ionización.¹⁶

Esta técnica no es selectiva a moléculas orgánicas, sino que detecta partículas que contienen carbono y proporciona información sobre la concentración en número de partículas, la concentración en masa y la masa de carbono en las partículas individuales (en el caso de partículas con geometría y composición conocidas se puede obtener el tamaño). Una de sus ventajas es que, debido a su elevada dilución, hay una menor aparición de efectos matriz, evitando así, la necesidad de manipular la muestra; aunque para matrices complejas se requieren diversas técnicas de extracción.¹⁷

1.3. ANÁLISIS DINÁMICO DE IMÁGENES

El análisis dinámico de imágenes (DIA) se engloba dentro de las técnicas ópticas y permite la caracterización de partículas en cuanto a su distribución de tamaño y la morfología.

El instrumento (figura 2) consta de una bomba peristáltica, la cual permite que la suspensión llegue a través de los tubos a la celda de flujo. La celda se ilumina con una fuente de luz LED de alta potencia y una cámara CCD toma imágenes de la celda, que son enviadas al ordenador y son procesadas por software de tratamiento de imagen. Una vez que la suspensión sale de la celda de flujo, ésta puede ser recirculada o desechada.

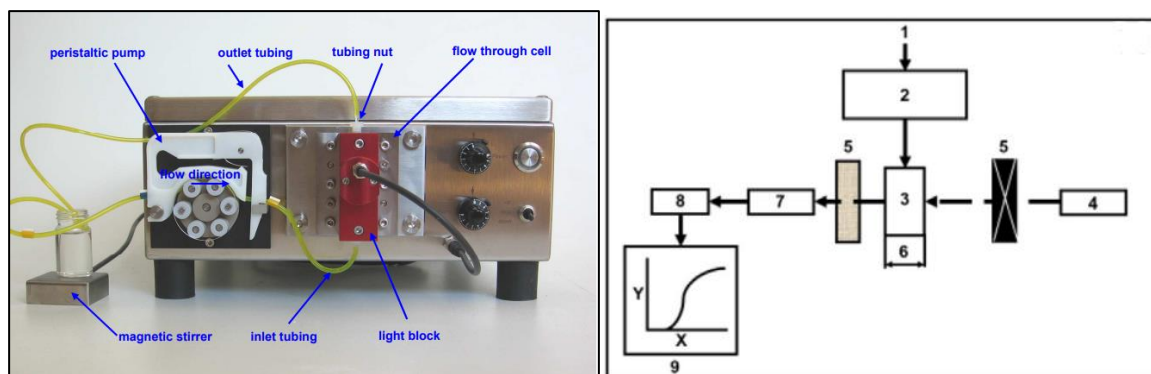


Figura 2. A la izquierda, sistema de análisis de partículas XPT-C. A la derecha, diagrama de un sistema de análisis de imágenes: (1) Suspensión de partículas, (2) bomba peristáltica, (3) Celda de flujo, (4) fuente de luz, (5) sistema óptico, (6) profundidad de campo, (7) cámara, (8) analizador de imágenes, (9) pantalla

Gracias al software, se puede realizar un procesamiento de imágenes para obtener imágenes de alta resolución, permitiendo convertir características morfológicas en datos cuantitativos. Los píxeles son la unidad básica de una imagen, un conjunto de píxeles constituye una imagen; no existe ningún elemento con una dimensión inferior a él. Además, a cada píxel se le asocia un valor correspondiente a un color, y puede representarse en escala de grises o a color.¹⁸ El software procesa las imágenes en tiempo real y los resultados obtenidos permiten manejar distintos parámetros relacionados con el tamaño, la forma y el número de partículas, como son distribución de tamaños, diámetro equivalente, longitud máxima, redondez o incluso permite almacenar secuencias de imágenes.

Además del análisis dinámico, también existe el análisis estático de imágenes, cuya principal diferencia es que las partículas se fijan en un soporte y no están en movimiento respecto a la cámara durante el análisis. Sin embargo, para la detección de microplásticos se prefiere el análisis dinámico, dado que la alimentación continua de partículas ofrece resultados más representativos al analizar un mayor número de partículas en un tiempo razonable. Se trata de una técnica rápida, sencilla y, respecto a otras técnicas analíticas, ofrece información más detallada acerca de la morfología de las partículas.

2. OBJETIVOS Y PLANTEAMIENTO

Dado el creciente uso de plásticos en la vida cotidiana y su impacto medioambiental, actualmente está surgiendo la necesidad de desarrollar técnicas que permitan una caracterización completa de microplásticos, de manera que dicha información pueda ser utilizada para solucionar el problema que están provocando y reducir su presencia en la naturaleza.

El principal objetivo de este Trabajo de Fin de Grado es el desarrollo y validación de métodos analíticos que permitan la caracterización (tamaño y forma) y cuantificación (concentración en número) de microplásticos empleando el análisis dinámico de imágenes (DIA). Como segundo objetivo está la preparación y caracterización de suspensiones de microplásticos de PVC y PET mediante DIA para su uso en investigaciones futuras.

Asimismo, otros de los objetivos de este trabajo son la integración en un proyecto de investigación, la aplicación de los conocimientos adquiridos a lo largo del grado en Química y la familiarización con el tratamiento de datos analíticos.

3. PARTE EXPERIMENTAL

3.1. INSTRUMENTACIÓN

Para la detección y caracterización de microplásticos se empleó el detector XPT-C Particle Analyser (PS Prozesstechnik GmbH, Suiza) equipado con una cámara CCD que permite captar imágenes en directo.

3.2. PATRONES

Se prepararon suspensiones a partir de estándares de poliestireno con diámetros certificados de $2,020 \pm 0,015$; $4,000 \pm 0,043$ y $5,000 \pm 0,042$ μm , y concentraciones nominales de 5×10^{11} , 5×10^{10} y 1×10^{10} L^{-1} , respectivamente (Thermo Scientific, EEUU); así como de $2,94 \pm 0,06$ μm (10 % (m/m)) y concentración nominal de $7,15 \times 10^{12}$ L^{-1} (Sigma Aldrich, EEUU). Para este último patrón, su concentración pudo ser confirmada mediante SP-ICP-MS. Todas las suspensiones se prepararon en agua ultrapura (Milli-Q Advantage, Francia) sin la adición de tensioactivos.

También se emplearon patrones de poliestireno certificados por BCR con diámetros de $2,223 \pm 0,013$; $4,821 \pm 0,019$ y $9,475 \pm 0,018$ μm .

3.3. MUESTRAS

Se analizaron muestras de PVC y PET molidos mediante molienda criogénica con nitrógeno líquido. Las distribuciones de tamaño de las partículas obtenidas se muestran en el Anexo 1.

3.4. PROCEDIMIENTOS

3.4.1. Análisis con DIA

Para la optimización de los distintos parámetros se trabajó con una suspensión de $1,52 \times 10^8$ L^{-1} preparada a partir del patrón de 5 μm (*Thermo*) por pesada en una balanza analítica AG245 (Mettler Toledo, España). Antes de su medición, se sonicó 10 segundos en baño ultrasónico (Sonorex Super RK 31, Bandelin, Alemania).

En cuanto al procesado de imágenes, se empleó el software XPT Optical Particle Analysis System (PS Prozesstechnik GmbH, Suiza), el cual consta de dos programas: el Programa de Análisis, donde se ajustan los parámetros y se observan las imágenes en directo; y el Programa de Resultados, donde se obtiene el informe con los resultados. Se grabaron 10 vídeos (cada uno de los cuales consta de 1000 imágenes) de la suspensión, con los que se trabajó para optimizar los parámetros.

3.4.2. Análisis de suspensiones de microplásticos

- Filtración

Se pesaron 0,500 g de PVC y se suspendieron en 10 mL de agua ultrapura; tras sonicar, se filtró empleando una jeringuilla de vidrio con un filtro de 10 μm , analizándose el filtrado resultante.

- Centrifugación

Se pesaron 0,100 g de PVC (o PET) y se suspendieron en 10 mL de agua ultrapura; se dividió en dos fracciones y, tras sonicar, se llevaron a centrifugar en una centrífuga Heraeus Multifuge X1R (Thermo Fisher Scientific, EEUU) equipada con un rotor basculante.

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1. PARÁMETROS BÁSICOS EN ANÁLISIS DINÁMICO DE IMÁGENES (DIA)

La técnica de análisis dinámico de imágenes permite llevar a cabo un estudio tanto cualitativo como cuantitativo: evaluar la morfología y la concentración en número de micropartículas en las muestras.

El funcionamiento del instrumento utilizado (figura 3) se basa en el bombeo de la suspensión de partículas mediante una bomba peristáltica hacia la celda de flujo, que está iluminada con una fuente de luz LED de alta potencia y una cámara CCD toma 30 imágenes por segundo, que se procesan en tiempo real por el software del equipo y que se almacenan en el ordenador para procesados posteriores.

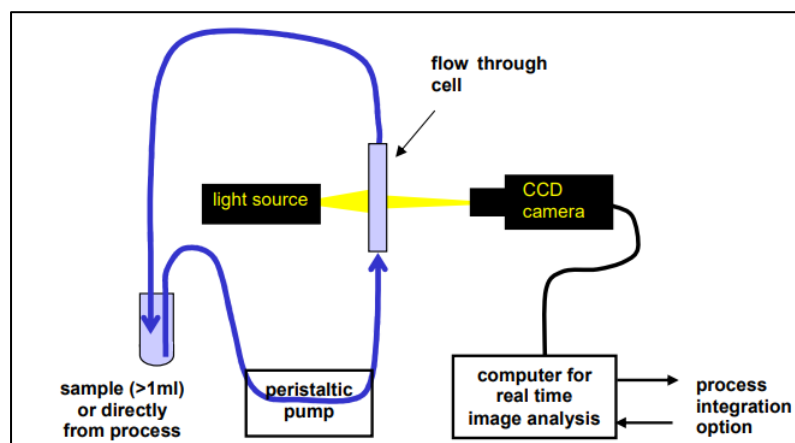


Figura 3. Esquema del funcionamiento del detector de análisis dinámico de imágenes.

Para que las partículas solo sean detectadas una vez por imagen es necesario determinar el caudal mínimo que debe atravesar la celda. De acuerdo con la resolución de la cámara (2048x1536 píxeles), la calibración (0,495 $\mu\text{m}/\text{píxel}$) y el espesor de la celda utilizada (0,2 mm), el volumen observado de celda es:

$$\text{Volumen celda} = \frac{2048 \text{ píxel} \times 0,495 \mu\text{m}/\text{píxel}}{1000} \times \frac{1536 \times 0,495 \mu\text{m}/\text{píxel}}{1000} \times 0,2\text{mm} = 0,154 \mu\text{L}$$

En el tiempo que dura la adquisición de una imagen, una partícula debe recorrer toda la celda, de forma que en la siguiente imagen todas las partículas serán distintas. Si se adquieren 30 imágenes por segundo (FPS) el caudal mínimo para que cada una de las partículas solo sea detectada una vez al atravesar la celda es:

$$\text{Caudal mínimo} = \text{Volumen celda} (\mu\text{L}) \times \text{FPS} \times \frac{60}{1000} = 0,28 \text{ mL}/\text{min}$$

El caudal utilizado a lo largo de este trabajo fue de 2,1 mL/min. En cuanto al procesado de imágenes, existen una serie de parámetros básicos que deben ser optimizados: *umbral*, se trata del valor de gris a partir del cual se separan los objetos del fondo; *brillo*, hace referencia a la nitidez de los bordes de las partículas; y *ruido*, se trata de distorsiones del brillo y color de la imagen que no corresponde con su valor real.

Aunque la optimización se hizo con una suspensión preparada a partir del patrón de poliestireno de *Thermo*, en una primera fase se realizó con patrones de *BCR*. Sin embargo, se descartaron estos resultados, ya que la suspensión original contiene una elevada concentración de tensioactivo, que da lugar a microburbujas que el detector identificaba como micropartículas y alteraban los resultados obtenidos.

4.2. DETERMINACIÓN DEL TAMAÑO DE PARTÍCULA MEDIANTE DIA

En las imágenes, los microplásticos están representados por su proyección bidimensional, cuyo tamaño es función de la orientación de las partículas. Por ello, el tamaño de las partículas se determinó como *diámetro equivalente*, que se define como el diámetro que tendría un círculo con un área igual a la proyección bidimensional de la partícula medida (figura 4). Se analizó este parámetro ya que las mediciones de las dimensiones lineales de la partícula, como son la longitud o el ancho, implican menos píxeles y, por tanto, son menos precisas.⁸

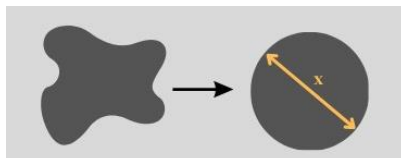


Figura 4. Representación del parámetro diámetro equivalente

Dado que el tamaño y la distribución de tamaño desempeñan un papel importante en el análisis de microplásticos, sigue siendo prioritario determinar con precisión las distribuciones de tamaño de partícula. Se va a asumir que las distribuciones son normales debido a su simetría y van a estar caracterizadas por el valor medio, ya que, al tratarse de una distribución simétrica, la moda y la medida tendrán el mismo valor. La anchura de la distribución está directamente relacionada con la dispersión de tamaños, y está cuantificada como coeficiente de variación (CV), siendo igual a la desviación estándar de los diámetros equivalente de las partículas medidas.¹⁹

4.2.1. Optimización de parámetros

Tras un estudio univariante se determinó que los dos parámetros más importantes son el *umbral* y el *brillo*. Tal y como se observa en la figura 5, para el parámetro *brillo*, se observó que el diámetro iba aumentando, pero llegaba un valor a partir del cual empezaba a estabilizarse en torno a 6 μm . Sin embargo, el coeficiente de variación disminuía.

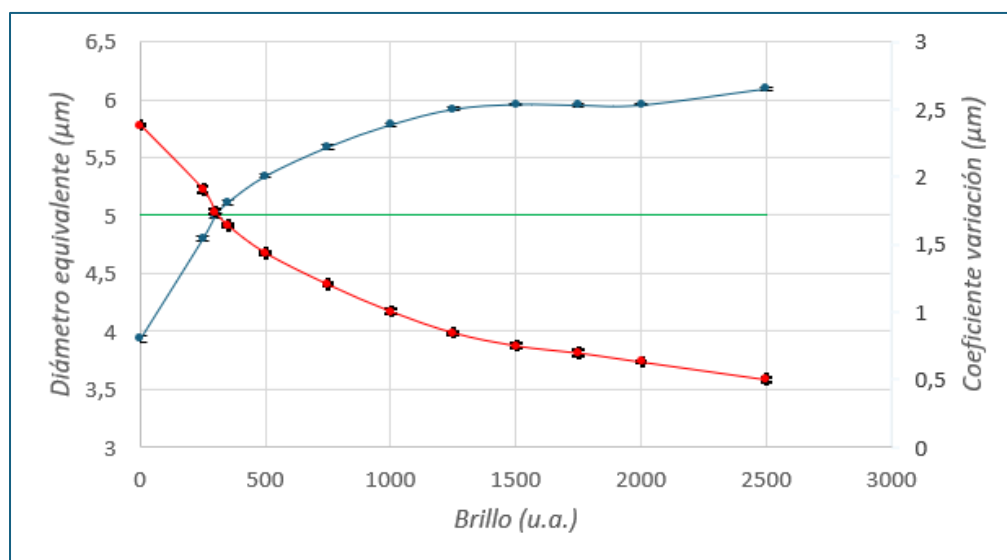


Figura 5. Diámetro equivalente (línea azul) y coeficiente de variación de la distribución (línea roja) en función del parámetro Brillo para partículas esféricas de PE de $5,000 \pm 0,042 \mu\text{m}$ (línea verde). Valores medios y desviación estándar ($n=5$ réplicas).

Con un valor de *brillo* de 2000 se realizó un estudio del parámetro *umbral* para lograr un diámetro próximo al valor de referencia y un coeficiente de variación adecuado (figura 6). Para el parámetro *umbral* se observó que, al aumentarlo, aumenta el diámetro y el coeficiente de variación va disminuyendo, obteniéndose una distribución más estrecha, para estabilizarse en torno a 0,6 μm .

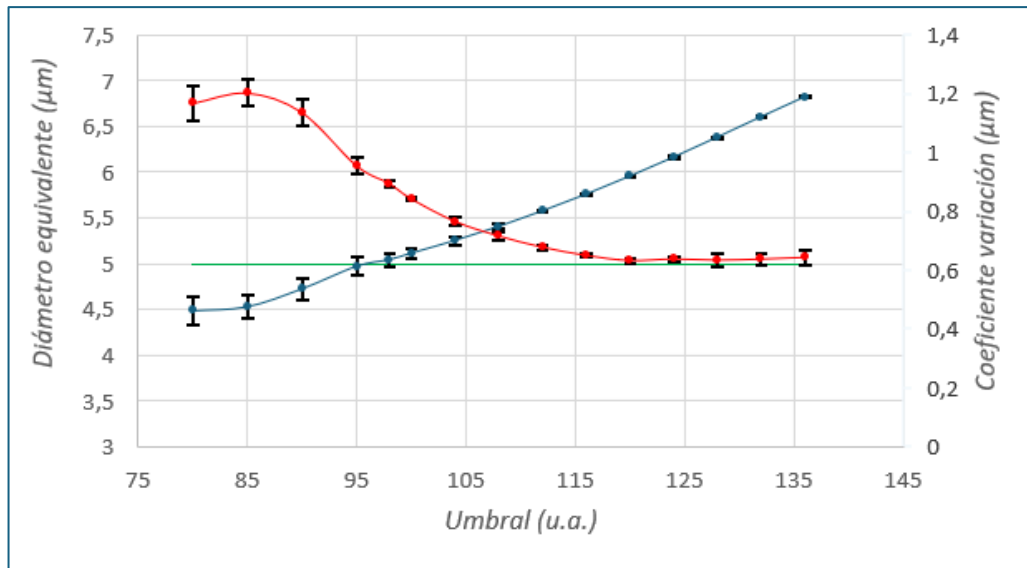


Figura 6. Diámetro equivalente (línea azul) y coeficiente de variación de la distribución (línea roja) en función del parámetro Umbral para partículas esféricas de PE de $5,000 \pm 0,042 \mu\text{m}$ (línea verde). Valores medios y desviación estándar ($n=5$ réplicas).

El parámetro *ruido* no se consideró para la optimización del tamaño ya que se estudió su influencia de manera individual y no aportaba mejoras significativas. Por tanto, buscando un equilibrio entre la anchura de la distribución y el diámetro, los parámetros óptimos que se establecieron para la determinación del diámetro de partícula fueron: *Umbral 98, Brillo 2000, Ruido 0*.

En la figura 7 se presentan las distribuciones de partículas de 3, 4 y 5 μm en las condiciones optimizadas. Se observa que, mientras que la distribución del patrón de 3 μm es prácticamente simétrica, las distribuciones de los patrones de 4 y 5 μm aparecen un poco sesgadas por la izquierda. Esto podría explicarse porque algunas de las micropartículas de la suspensión atraviesan la celda en planos más alejados de la cámara y esta no detecta correctamente su verdadero diámetro.

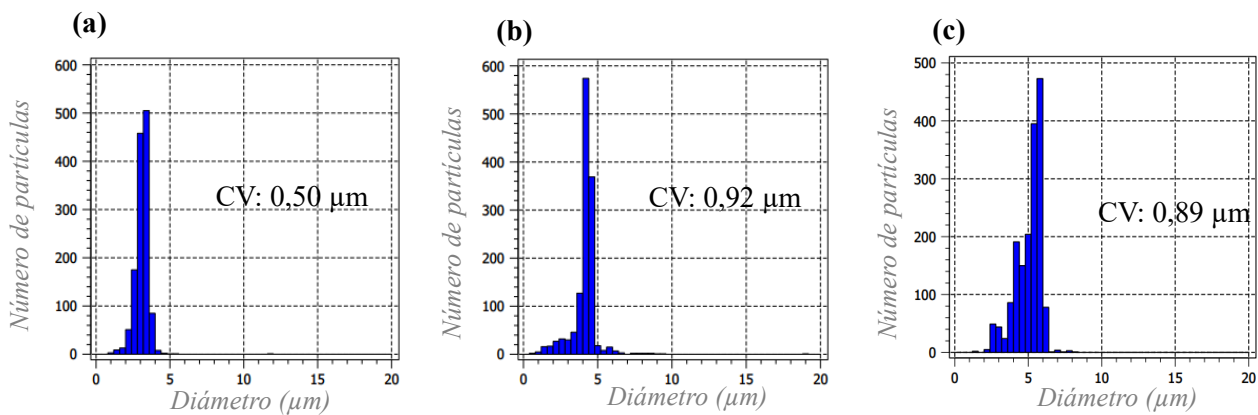


Figura 7. Distribuciones de diámetro de partícula de (a) 3 μm , (b) 4 μm y (c) 5 μm . Parámetros de procesamiento de imágenes: *Umbral 98, Brillo 2000, Ruido 0*.

4.2.2. Validación del método

Según la definición de la ISO 17025²⁰, la validación de un método analítico es la confirmación, a través de examen y el aporte de evidencias objetivas, que se cumplen los requisitos particulares para un uso específico previsto del mismo. En este caso, la validación del método se realizó en el propio laboratorio y consistió en un estudio, en el que se definieron cada uno de los parámetros analíticos, con

el objetivo de confirmar que el método analítico empleado posee unas prestaciones adecuadas a su aplicación.

Para evaluar la calidad de los resultados, se emplea el término de exactitud (proximidad de un único resultado a un valor de referencia) y se cuantifica con la incertidumbre. Con el objetivo de estudiar los errores sistemáticos y aleatorios, la exactitud se compone de dos factores: la veracidad y la precisión.

- **Veracidad**

Es la proximidad de la medida de un número infinito de resultados a un valor de referencia y se evalúa cuantitativamente con el sesgo.²¹

$$b(\%) = \frac{\bar{x} - x_{ref}}{x_{ref}} \times 100 \quad (1)$$

donde b es el sesgo, \bar{x} es el valor del diámetro equivalente experimental y x_{ref} es el valor del diámetro certificado.

En las condiciones optimizadas se consigue un diámetro de partícula de $5,002 \pm 0,067 \mu\text{m}$, el cual se comparó mediante un *test t*, con un nivel de confianza del 95 %, con el valor de referencia y se obtuvo que no son significativamente distintos. Además, se analizaron suspensiones de los patrones de $3 \mu\text{m}$ y $4 \mu\text{m}$ y se realizaron los respectivos *test t*. Los resultados de los test t se recogen en el Anexo 2. En la tabla 1 se recogen los valores de sesgo para los tres diámetros estudiados. Aunque estos aumentaron al reducir el tamaño de partícula, se consideraron aceptables, al no superar el 10 %.

Tabla 1. Comparación de los diámetros experimentales con los teóricos de distintos patrones en función del sesgo empleando las condiciones: Umbral 98, Brillo 2000, Ruido 0

Diámetro certificado μm	Diámetro experimental μm	Sesgo %
$2,94 \pm 0,06$	$3,1148 \pm 0,0077$	5,95
$4,000 \pm 0,043$	$4,154 \pm 0,025$	3,85
$5,000 \pm 0,042$	$5,002 \pm 0,067$	0,04

- **Precisión**

La precisión es una medida que indica cómo de próximos están los resultados entre sí y se expresa mediante la desviación estándar calculada a partir de resultados obtenidos mediante medidas repetidas. Para obtener la precisión, se debe determinar la repetibilidad y la reproducibilidad de medición. La repetibilidad es una medida de la variabilidad en los resultados cuando una medición la realiza un solo analista en las mismas condiciones de medida, mientras que la reproducibilidad es una medida de la variabilidad en los resultados entre laboratorios. Sin embargo, cuando los resultados se obtienen en el mismo laboratorio, existe un término, precisión intermedia, que ofrece una estimación de la variación en los resultados al cambiar alguna condición de medida, en este caso, los resultados obtenidos en diferentes días.²¹ En la tabla 2 se muestran estos parámetros correspondientes a los patrones con distintos tamaños.

Tabla 2. Parámetros de repetibilidad ($n=6$ réplicas) y precisión intermedia ($n= 6$ réplicas) para cada uno de los patrones certificados en la validación del tamaño de partícula

Diámetro μm	Repetibilidad %	Precisión intermedia %
2,94 \pm 0,06	2,48	2,77
4,000 \pm 0,043	1,23	1,89
5,000 \pm 0,042	1,07	2,49

- **Selectividad**

Es el grado en el que un método puede ser utilizado para determinar analitos particulares en mezclas o matrices sin interferencias de otros componentes de comportamiento similar.²¹ En este caso, la técnica analítica no es selectiva, ya que es capaz de detectar todo tipo de partículas, independientemente de su composición.

- **Intervalo de trabajo**

Es el intervalo en el cual el método proporciona resultados con una incertidumbre aceptable. Viene determinado por el límite de cuantificación en la parte inferior, y las concentraciones a las cuales se observan anomalías significativas en la parte superior del intervalo.²¹

En las condiciones utilizadas, la resolución de la cámara CCD es de 0,495 micras/píxel, lo que fija el límite de detección en 0,5 μm . El límite superior está determinado por el tamaño de la imagen, que es de 2048 x 1536 píxeles; por lo que la esfera máxima que se podría visualizar sería de 760 μm de diámetro. A pesar del límite de 0,5 μm , partículas con un diámetro medio de 2 μm , serán sobreestimadas por el detector, ya que la cola de distribución a diámetros menores es detectada parcialmente.

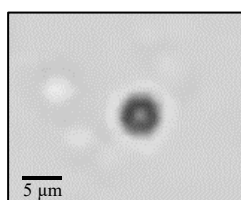


Figura 8. Imagen de una partícula esférica del patrón Thermo con un diámetro certificado de 5,000 \pm 0,042 μm .

4.3. DETERMINACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN EN NÚMERO DE PARTÍCULAS MEDIANTE DIA

4.3.1. Optimización de parámetros

Al realizar un estudio univariante, se observó que el parámetro *umbral* aumentaba el número de partículas hasta llegar a un valor donde se incrementaba de manera significativa; sin embargo, el parámetro *ruido* lo disminuía.

Por ello, se optó por elegir un valor de *umbral* alto (de 170) y optimizar el parámetro *ruido*, ya que se detectaban como partículas píxeles individuales que aparecía en los laterales de la imagen.

A la vista de los resultados presentados en la figura 9, se optó por emplear un valor de *ruido* de 2 y, a partir de ahí, se estudió el parámetro *brillo*.

Se observó que el parámetro *brillo* consiguió disminuir aún más los píxeles individuales de los laterales de la imagen y aquellas partículas de un diámetro menor que distorsionaban la distribución (figura 10). Por tanto, aquel valor de *brillo* que proporcionaba una distribución normal con un número

de partículas mayor fue de 1500. De manera que, las condiciones óptimas para el análisis del número de partículas fueron: *Umbral 170, Brillo 1500, Ruido 2*

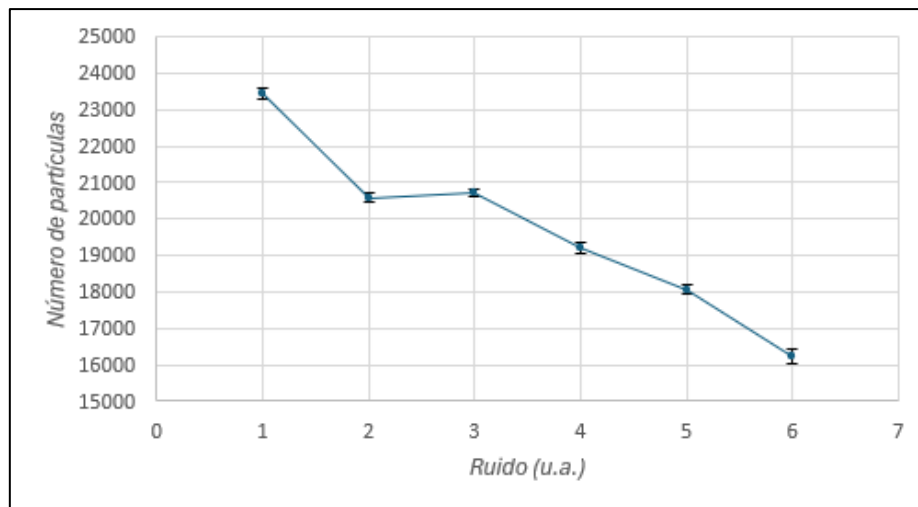


Figura 9. Número de partículas en función del parámetro ruido para partículas esféricas de PE de $5,000 \pm 0,042 \mu\text{m}$. Valores medios y desviación estándar ($n=5$ réplicas).

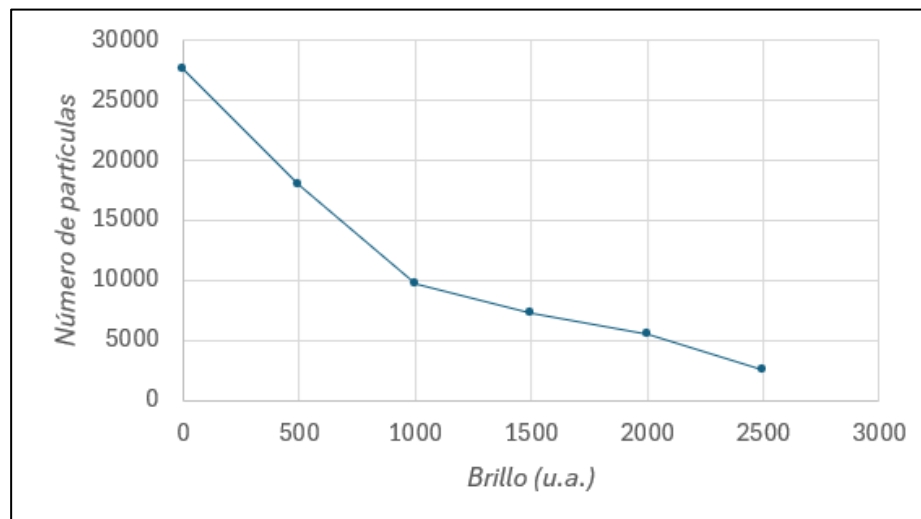


Figura 10. Número de partículas en función del parámetro brillo para partículas esféricas de PE de $5,000 \pm 0,042 \mu\text{m}$. Valores medios y desviación estándar ($n=5$ réplicas).

4.3.2. Calibración

El número de partículas presentes en las imágenes registradas se puede calcular a partir del volumen de celda, el número de imágenes registradas y la concentración de la suspensión medida.

$$\text{Volumen de suspensión analizada } (\mu\text{L}) = N^{\circ} \text{ imágenes} \times \text{Volumen celda} (\mu\text{L}) \quad (2)$$

$$\text{Número de partículas} = \frac{\text{Volumen analizado } (\mu\text{L}) \times \text{Concentración } (L^{-1})}{10^6} \quad (3)$$

El estudio se realizó con una suspensión de concentración $1,52 \times 10^8 L^{-1}$ y se registraron 1000 imágenes. Dado que el volumen de celda es $0,154 \mu\text{L}$, el número de partículas que se podrían detectar es de 23431. Con las condiciones óptimas se detectan 7287 partículas, lo cual nos indica que tenemos un rendimiento de detección del 31%. Esto es debido a que no todas las partículas están en el mismo plano focal y su desenfoque puede dar lugar a que no sean detectadas. Además, en las condiciones utilizadas, los diámetros equivalentes obtenidos no tienen validez, al estar sobreestimados. Por este

motivo, la técnica DIA no puede considerarse una técnica absoluta para la determinación de concentraciones en número y requiere de una calibración con patrones de concentración conocida. En nuestro caso, se utilizó el patrón de 5 μm (*Thermo*). Aunque sólo tiene certificado el diámetro de partícula, el fabricante también proporciona información sobre la concentración en número, que será utilizada para realizar la calibración. En la figura 11 se presenta una calibración preparada a partir de este patrón.

En primer lugar, se realizó una recta de calibrado con concentraciones espaciadas en un rango de 0 a $1,81 \times 10^9 \text{ L}^{-1}$. Se realizó un análisis de regresión y, mediante la comparación de pendientes y el análisis de residuales, se determinó que el último punto estaba fuera del rango lineal.

Una vez eliminado ese punto, se realizó un análisis de la regresión, estudiando si se cumple la homocedasticidad mediante el análisis de los residuales, es decir, si los datos son aleatorios y no hay ninguna tendencia. Se observó que se cumple la condición de homocedasticidad y, por tanto, la recta de calibración se puede utilizar para cuantificar.

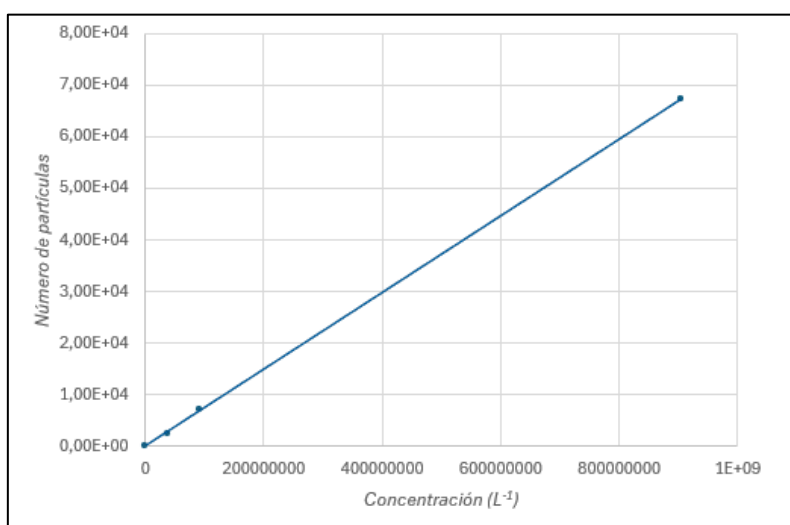


Figura 11. Recta de calibrado preparada a partir del patrón de 5 μm (*Thermo*) hasta el último punto dentro del intervalo de trabajo.

4.3.3. Validación del método

En el Anexo 3 se describen detalladamente cada una de las operaciones para obtener los valores de los parámetros.

- **Selectividad**

Al igual que ocurre con la determinación del tamaño de partícula, la técnica analítica no es selectiva, detecta todo tipo de partículas.

- **Límite de detección y cuantificación**

El límite de detección (LOD) es la concentración más baja del analito que puede ser detectada por el método a un nivel de confianza especificado, mientras que el límite de cuantificación (LOQ) es la concentración más baja de analito que puede ser cuantificada con precisión en una muestra.²¹

Las expresiones que se aplican habitualmente son:

$$LOD = \frac{3 \sigma_{blanco}}{b} = \frac{3 \sqrt{m}}{b} \quad (4)$$

$$LOQ = \frac{10 \sigma_{blanco}}{b} = \frac{10 \sqrt{m}}{b} \quad (5)$$

donde σ_{blanco} es la desviación estándar del blanco y b es la pendiente de la recta de calibrado obtenida con el patrón de referencia. Como el conteo de partículas viene determinado por la distribución de probabilidad de Poisson, la desviación estándar de dicha distribución es igual a la raíz cuadrada de su valor medio (\bar{m}), por lo que $\sigma_{blanco} = \sqrt{\bar{m}}$. Para la estimación de ambos parámetros, se midieron 10 blancos de agua ultrapura.

- **Intervalo de trabajo**

Para evaluar el intervalo de trabajo, hay que confirmar que la respuesta del instrumento sigue una relación lineal y verificar el procedimiento de calibración instrumental.

- **Sensibilidad analítica**

Es la variación de la respuesta del instrumento que corresponde a una variación de la magnitud medida y viene determinada por la pendiente de la recta de calibración.²¹

- **Veracidad**

Para su evaluación, se emplearon diferentes suspensiones de patrones de micropartículas de tamaños distintos al utilizado para preparar la recta de calibrado y posteriormente se interpolaron en una recta de calibrado preparada a partir del patrón de microesferas de PS de 3 μm (*Sigma*), ya que era el único patrón cuya concentración nominal pudo ser confirmada mediante SP-ICP-MS. Se empleó una suspensión de micropartículas de 4 μm con una concentración nominal de $4,93 \times 10^8 \text{ L}^{-1}$, y otra suspensión de micropartículas de 5 μm con una concentración nominal de $2,46 \times 10^8 \text{ L}^{-1}$.

El sesgo se determinó a partir de la ecuación (1) donde \bar{x} es el valor de la concentración obtenido al interpolar en la recta de calibrado, y x_{ref} es el valor correspondiente a la concentración nominal del patrón medido.

- **Precisión**

Como se ha mencionado en el apartado 4.2.2., la precisión se determina a partir de la repetibilidad y la precisión intermedia. Para evaluar la repetibilidad, se midió 6 veces una misma disolución de patrón de referencia; mientras que, para determinar la precisión intermedia, a lo largo de varios días, se preparó una disolución en las mismas condiciones y se midió. De esta manera, mediante un análisis de la varianza se determinó ambos parámetros.

- **Robustez**

Es una cualidad del método que mide su capacidad de resistir pequeños cambios en las condiciones operatorias sin que su funcionamiento se vea alterado, es decir, proporciona una indicación de la fiabilidad del método.²¹

Para poder evaluar la robustez se requiere hacer cambios en el método, identificar las variables que tienen un efecto más significativo y garantizar que están controladas. En este caso, dado que hay dos tipos de condiciones en función de si se determina el tamaño o la concentración, indica que al cambiar las condiciones operatorias los resultados van a variar y por tanto, no es un método muy robusto.

En la tabla 3 se muestran las prestaciones analíticas de DIA para la determinación de la concentración en número de partículas. Los resultados obtenidos para el sesgo no pueden considerarse

definitivos, ya que las suspensiones de microesferas de poliestireno utilizadas sólo están certificadas en relación al diámetro, y la información de concentración que proporciona el fabricante sólo es orientativa.

Tabla 3. Prestaciones analíticas de DIA para la determinación de la concentración en número de partículas

Parámetro	Valor
Límite de detección	$4,31 \times 10^5 \text{ L}^{-1} *$
Límite de cuantificación	$1,44 \times 10^6 \text{ L}^{-1} *$
Intervalo de trabajo	$1,44 \times 10^6 \text{ L}^{-1} - 5,06 \times 10^8 \text{ L}^{-1} *$
Sensibilidad analítica	$4,59 \times 10^4 \pm 2,1 \times 10^4 \text{ L}^{-1} (n=3) *$
Sesgo	- 3 % ($4 \mu\text{m}$, $4,93 \times 10^8 \text{ L}^{-1}$) * 56 % ($5 \mu\text{m}$, $2,46 \times 10^8 \text{ L}^{-1}$) *
Repetibilidad	2,6 % **
Precisión intermedia	15 % **

*Calculado a partir de la calibración con el patrón de microesferas de poliestireno de $3 \mu\text{m}$ (*Sigma*)

**Calculado a partir de un patrón de microesferas de poliestireno de $5 \mu\text{m}$ (*Thermo*)

De esta manera, la validación del método ha proporcionado las limitaciones y capacidades que tiene la técnica empleada; sin embargo, para comprobar que permanece bajo control, deberán hacerse controles de calidad en el análisis rutinario para comprobar que los resultados que se obtienen son fiables y representativos.²¹

4.4. ANÁLISIS DIRECTO DE SUSPENSIONES DE MICROPLÁSTICOS

A pesar de la importancia que ha adquirido en los últimos tiempos la detección de microplásticos, hay una carencia de patrones de microplásticos, estando restringidos en la práctica a partículas de poliestireno de distintos diámetros y con distintos grupos funcionales en su superficie. Por esta razón, como segundo objetivo de este TFG, se prepararon y caracterizaron suspensiones de micropartículas de cloruro de polivinilo (PVC) y de tereftalato de polietileno (PET) a partir de los correspondientes plásticos molidos, con el objetivo de poder ser empleadas en futuras investigaciones con estos materiales.

El PVC es un termoplástico con una gran variedad de aplicaciones, como son la fabricación de tuberías, envases para alimentación, juguetes o incluso aplicaciones médicas. Se trata de un polímero de adición, ya que se obtiene a partir de un monómero con doble enlace (cloruro de vinilo); y, además, la unidad de repetición estructural es la misma que la del monómero de partida. Las diferentes cadenas se mantienen unidas gracias a interacciones dipolo-dipolo, ya que existe una atracción entre los átomos de cloro de una molécula y los átomos de hidrógeno de otra, lo que le convierte en un polímero rígido (figura 12).²²

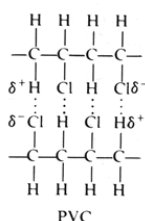


Figura 12. Interacciones dipolo-dipolo entre las distintas cadenas de PVC.

Destaca por su bajo coste y su gran resistencia química; sin embargo, a altas temperaturas puede modificarse su estructura, ya que pueden formarse enlaces lábiles al formarse uniones cabeza-cabeza o cola-cola.

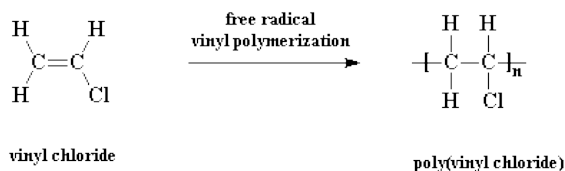


Figura 13. Estructura del policloruro de vinilo obtenido a partir de la polimerización por radicales libres del cloruro de vinilo.

Por otro lado, el PET es otro termoplástico con un alto grado de cristalinidad cuyos principales usos son envases de bebidas, bandejas, artículos de farmacias, medicamentos, ... Se trata de un polímero lineal que se forma a partir de la policondensación del monómero monoetilen tereftalato, el cual surge de la combinación del ácido tereftálico y el etilenglicol en una reacción de esterificación usando como catalizador el trióxido de antimonio. Debido a la presencia de grupos aromáticos (voluminosos y polarizables), la cadena principal presenta una gran rigidez.²²

Entre sus propiedades destacan su resistencia al desgaste y a la corrosión, así como una buena resistencia química y térmica. Dado el gran aumento que ha alcanzado en su uso como envases de productos alimenticios, es importante el estudio de los microplásticos que se pueden llegar a generar.

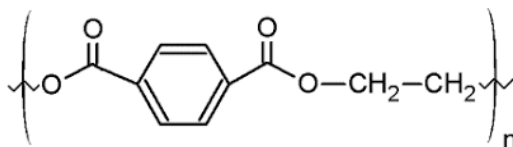


Figura 14. Estructura del polímero tereftalato de polietileno

Los materiales de partida consistieron en PVC y PET procedentes de un molido criogénico, que permitió obtener partículas con tamaños por debajo de 300 y 1000 μm , respectivamente, pero mayoritariamente por encima de 10 μm , tal y como puede verse en el anexo 1. Como el rango de tamaños de partícula de interés estaba por debajo de los 10 μm , se procedió a fraccionar ambas muestras mediante centrifugación.

Con el objetivo de realizar el fraccionamiento de las suspensiones de microplásticos, 5 mL de suspensión de plástico molido (PVC o PET) se sometieron a diferentes programas de centrifugación para el aislamiento de partículas de diversos tamaños. Como ambos plásticos tienen densidades similares (1,40 g/ mL) se utilizaron condiciones similares de centrifugación para ambos. Tal y como se muestra en la figura 15, los sobrenadantes fueron analizados directamente; mientras que los sólidos acumulados en el fondo del tubo se resuspendieron en 5 mL de agua ultrapura para su análisis. En la tabla 4 se recogen las condiciones de centrifugación calculadas para separar distintos tamaños de partículas (5, 3, 2 y 1 μm). Los cálculos para obtener las condiciones de cada programa están reflejados en el anexo 4. El objetivo de los programas denominados 1.* es conseguir aislar aquellas partículas inferiores al tamaño especificado; mientras que el objetivo del programa 2 consiste en depositar en el fondo del tubo las partículas fraccionadas anteriormente con un límite inferior de 1 μm , con el fin de aislar dicha fracción..

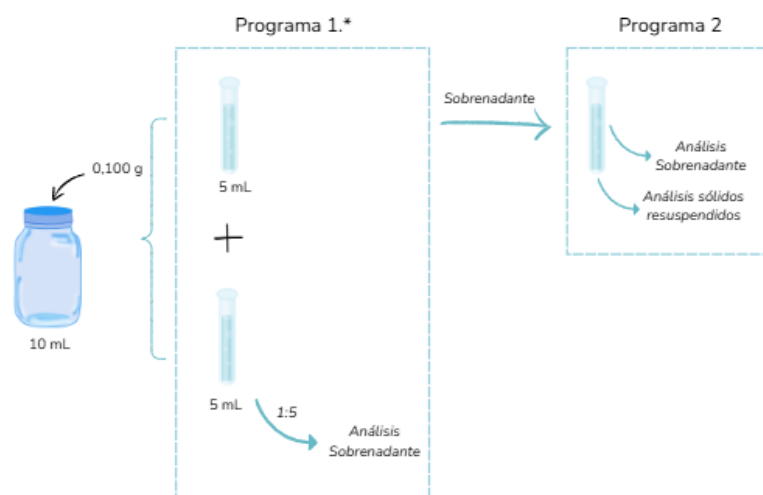


Figura 15. Esquema del fraccionamiento de las suspensiones de microplásticos utilizando los diferentes programas de centrifugación.

Tabla 4. Condiciones de centrifugación para el fraccionamiento de microplásticos

Programa	Condiciones	Diámetro teórico de partículas en el sobrenadante
1.1	500 rpm, 3,5 min, 20°C	Inferiores a 5 μm
1.2	500 rpm, 10 min, 20°C	Inferiores a 3 μm
1.3	750 rpm, 10 min, 20°C	Inferiores a 2 μm
2	3000 rpm, 2,5 min, 20°C	Inferiores a 1 μm

También se evaluó la posibilidad de utilizar la filtración utilizando filtros con tamaño de poro de 10 μm . Como puede observarse en el Anexo 5, no se obtuvieron buenos resultados por lo que se optó por emplear la centrifugación para el fraccionamiento de partículas.

4.4.1. Parámetros básicos para el análisis de suspensiones de microplásticos

En lo referente al análisis, el tamaño de las partículas se caracteriza genéricamente por su *diámetro equivalente*. Sin embargo, dado que en este caso las partículas no van a ser necesariamente esféricas, se consideran otros parámetros morfológicos (figura 16). Se pueden diferenciar parámetros de forma (adimensionales), cuyos valores se encuentran entre 0 y 1, siendo los valores iguales o cercanos a 1 los que caracterizan partículas casi esféricas, y parámetros de tamaño, que hacen referencia a las dimensiones de las partículas, y por tanto presentan unidades de longitud.

Dentro de los parámetros de forma, se hizo una selección de aquellos que aportan una mayor información y más variada. El primero de ellos es la *relación de aspecto*, que es el cociente entre la longitud mínima y máxima de las partículas y describe el grado de alargamiento de una partícula. Otro de los parámetros es la *circularidad*, que describe cuánto se desvía la forma de la partícula de la de una esfera perfecta y se calcula a partir de la relación entre el área de la partícula y su perímetro.

Al estudiar los parámetros de tamaño, un parámetro importante es el *lado largo del rectángulo delimitador*, que indica la longitud del lado más largo de un rectángulo que se ajusta alrededor de la partícula y, por tanto, define si esa partícula se considera microplástico. Otro parámetro a destacar es el *lado corto del rectángulo delimitador*, que determina la longitud más pequeña de un rectángulo que encierra la partícula en una imagen.²⁴

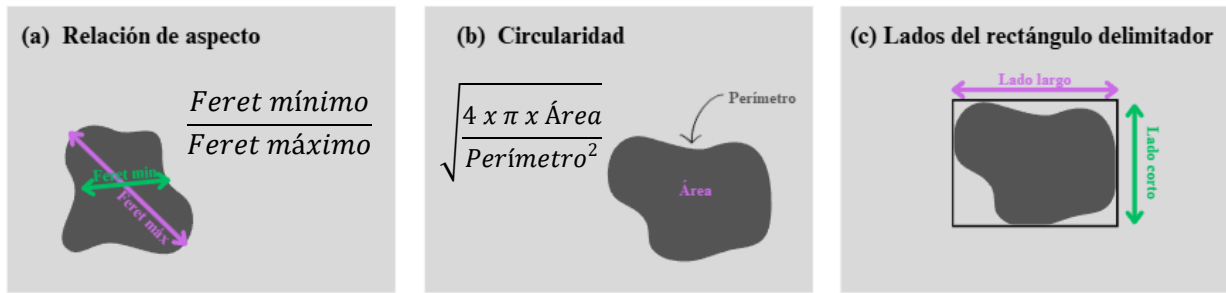


Figura 16. Representación de parámetros para describir la forma y el tamaño de las micropartículas

4.4.2. Análisis de suspensiones de microplásticos de PVC

Las medidas de las suspensiones de microplásticos se realizaron tanto en condiciones de determinación de tamaño (*Umbral 98, Brillo 2000, Ruido 0*) como en condiciones de determinación de concentración en número de partículas (*Umbral 170, Brillo 1500, Ruido 2*). Se realizó un primer ensayo empleando el programa de centrifugación 1.1, y un segundo ensayo empleando el programa 1.2 para conseguir un corte de tamaños más ajustado.

En cuanto a la determinación de tamaño, las imágenes de la figura 17 muestran la gran diversidad de formas irregulares que presentan las micropartículas, alejándose de la esfericidad de las micropartículas del patrón de referencia de *Thermo*. Por tanto, se estudiaron aquellos parámetros mencionados en el apartado 4.4.1.

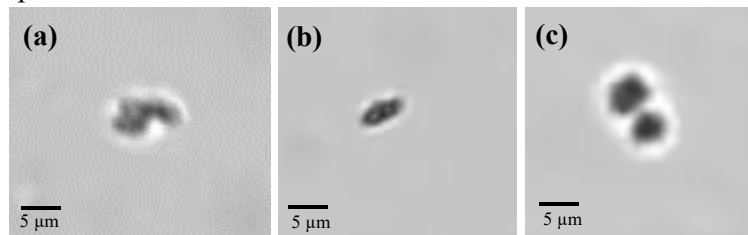


Figura 17. Ejemplos de imágenes tomadas por la cámara CCD del detector XPT-C de microplásticos de PVC con diversas formas irregulares.

En la tabla 5, los resultados muestran que en la suspensión de microplásticos de PVC, las partículas son más alargadas que las partículas de patrón de 3 μm (mayor *lado largo del rectángulo delimitador*), y además menos esféricas, ya que tanto la *relación de aspecto* como la *circularidad* se alejan más del valor 1.

Tabla 5. Parámetros de forma y tamaño ($n=5$ réplicas) cuantificados en sobrenadante de la centrifugación de PVC

Parámetro	PVC	PVC	PS patrón 3 μm
	(Programa 1.1)	(Programa 1.2)	
Diámetro equivalente	3,324 ± 0,061 μm	3,14 ± 0,13 μm	2,94 ± 0,06 μm
Lado largo rectángulo delimitador	4,67 ± 0,13 μm	4,29 ± 0,19 μm	3,247 ± 0,011 μm
Lado corto rectángulo delimitador	2,829 ± 0,064 μm	2,63 ± 0,11 μm	2,9210 ± 0,0055 μm
Relación de Aspecto	0,628 ± 0,016	0,646 ± 0,019	0,9009 ± 0,0014
Circularidad	0,7654 ± 0,0054	0,7830 ± 0,0047	0,8886 ± 0,0015

Los resultados obtenidos tras el fraccionamiento utilizando el programa 1.1 muestran que hay un 57 % de partículas inferiores a un diámetro equivalente de 3 μm; lo cual indica que el fraccionamiento se ha desarrollado con éxito. Al repetir el ensayo con el programa 1.2, se observó que el 67 % de partículas eran inferiores a 3 μm, por tanto, se consiguió desplazar la distribución hacia un menor rango como se refleja en la figura 18. Esto demuestra que empleando unas condiciones de centrifugación más

drásticas es posible el fraccionamiento de micropartículas de menor tamaño. Los histogramas referentes a cada uno de los ensayos se muestran en el Anexo 6.

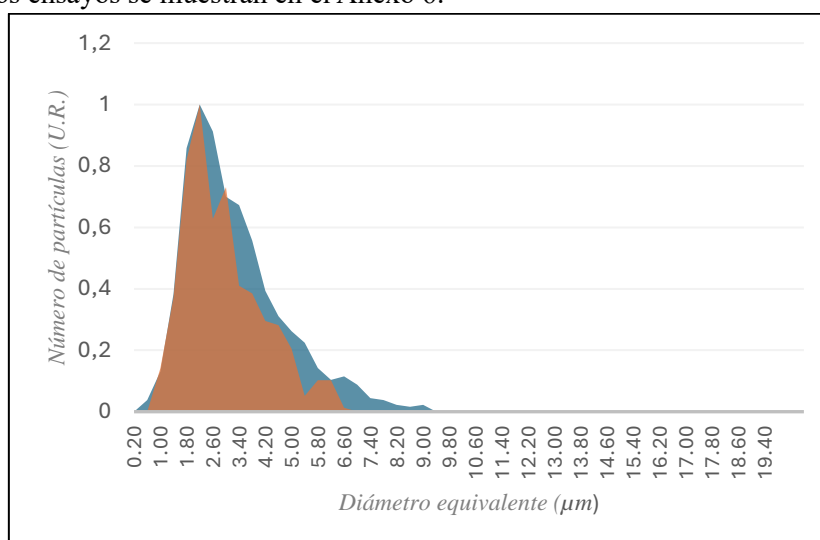


Figura 18. Comparación de las distribuciones de diámetro equivalente normalizadas correspondientes al programa 1.1 (azul) y al programa 1.2 (naranja) en condiciones de tamaño en suspensiones de microplásticos de PVC.

En lo referente a la determinación de la concentración, las partículas cuantificadas se interpolaron en una recta preparada a partir del patrón de 5 µm (*Thermo*), obteniéndose para cada ensayo los resultados que se recogen en la tabla 6.

Tabla 6. Concentraciones en número de partículas determinadas en los ensayos de centrifugación con PVC

Ensayo	Programa centrifugación	Sobrenadante	Resuspensión
1	1.1	5,63 x 10 ⁸ L ⁻¹	
	2	1,30 x 10 ⁷ L ⁻¹	1,49 x 10 ⁸ L ⁻¹
2	1.2	1,54 x 10 ⁸ L ⁻¹	
	2	5,69 x 10 ⁶ L ⁻¹	2,38 x 10 ⁷ L ⁻¹

La fracción de partículas menores de 5 y 3 µm y mayores de 1 µm, aisladas en el fondo del tubo con el programa de centrifugación 2, se resuspendieron en 5 mL de agua ultrapura, midiéndose la concentración de las suspensiones obtenidas para evaluar la capacidad de recuperación de dicha fracción. A la vista de los resultados de la tabla 6, se obtuvo una recuperación del 28% para las partículas del ensayo 1; mientras que para las partículas del ensayo 2 la recuperación fue del 16%.

4.4.3. Análisis de suspensiones de microplásticos de PET

Al igual que las medidas anteriores, para el PET, las medidas también se realizaron tanto en condiciones de determinación de tamaño (*Umbral 98, Brillo 2000, Ruido 0*) como en condiciones de determinación de concentración en número de partículas (*Umbral 170, Brillo 1500, Ruido 2*). En este caso, se realizó un primer ensayo empleando el programa de centrifugación 1.2, y un segundo ensayo empleando el programa de centrifugación 1.3.

En la determinación de tamaño se observa que, al igual que ocurría con los microplásticos de PVC, estas partículas tampoco son perfectamente esféricas, sino que presentan diversas morfologías irregulares, como se muestra en la figura 19. Por tanto, se estudiaron los parámetros de forma y tamaño mencionados en el apartado 4.4.1.

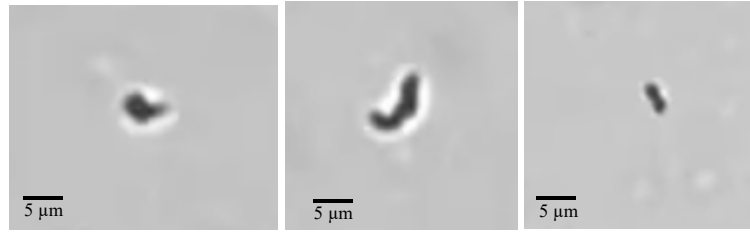


Figura 19. Ejemplos de imágenes tomadas por la cámara CCD del detector XPT-C de microplásticos de PET con diversas formas irregulares.

En la tabla 7, se observa que los parámetros de forma (*relación de aspecto* y *circularidad*) distan del valor 1, lo que indica que se alejan de la esfericidad. Además, el *lado largo del rectángulo delimitador* muestra que son partículas más alargadas.

Tabla 7. Parámetros de forma y tamaño ($n=3$ réplicas) cuantificados en sobrenadante de la centrifugación de PET

Parámetro	PET (Programa 1.2)	PET (Programa 1.3)	PS patrón 3 µm
Diámetro equivalente	$4,72 \pm 0,52 \mu\text{m}$	$2,904 \pm 0,057 \mu\text{m}$	$2,94 \pm 0,06 \mu\text{m}$
Lado largo rectángulo delimitador	$6,59 \pm 0,65 \mu\text{m}$	$3,855 \pm 0,086 \mu\text{m}$	$3,247 \pm 0,011 \mu\text{m}$
Lado corto rectángulo delimitador	$4,02 \pm 0,51 \mu\text{m}$	$2,443 \pm 0,034 \mu\text{m}$	$2,9210 \pm 0,0055 \mu\text{m}$
Relación de Aspecto	$0,663 \pm 0,026$	$0,6825 \pm 0,0059$	$0,9009 \pm 0,0014$
Circularidad	$0,776 \pm 0,011$	$0,8028 \pm 0,0028$	$0,8886 \pm 0,0015$

Los resultados muestran que la centrifugación empleando el programa 1.2 ha permitido obtener un 37 % de partículas inferiores a 3 µm; mientras que con el programa 1.3, se ha obtenido un 69% de partículas inferiores a 3 µm. Por tanto se concluye que, para el fraccionamiento de microplásticos de PET, es necesario unas condiciones más drásticas en la centrifugación. En la figura 20 se puede observar una comparación de las dos distribuciones de los dos fraccionamientos realizados, reflejándose el desplazamiento de la distribución de partículas empleando el programa 1.3, lo que indica que el empleo de condiciones más drásticas en la centrifugación permite el fraccionamiento de partículas de menor tamaño.

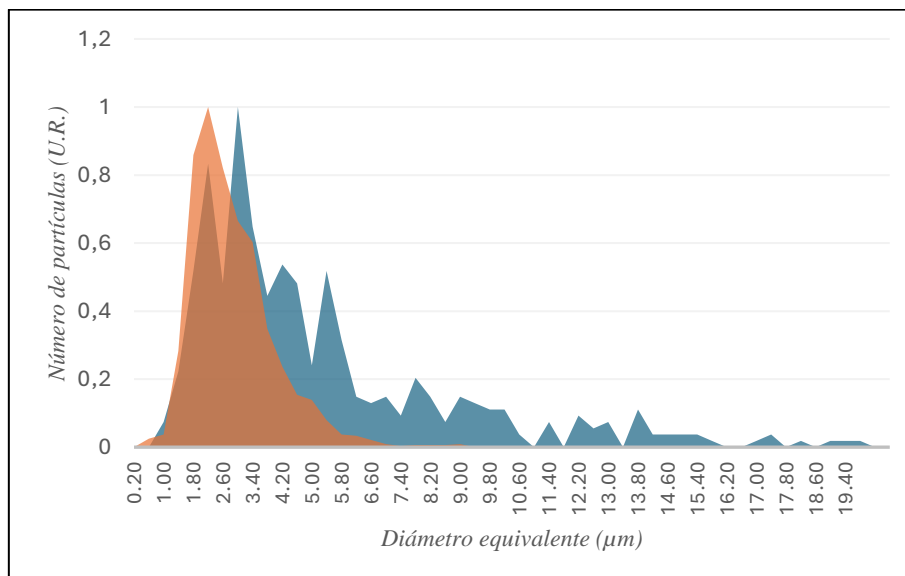


Figura 20. Comparación de las distribuciones de diámetro equivalente normalizadas correspondientes al programa 1.2 (azul) y al programa 1.3 (naranja) en condiciones de tamaño en suspensiones de microplásticos de PET.

En lo referente a la determinación de la concentración, se cuantificó un número de partículas, el cual fue interpolado en una recta preparada a partir del patrón de 5 μm (*Thermo*), obteniéndose para cada ensayo los resultados que se recogen en la tabla 8.

Tabla 8. Concentraciones en número de partículas determinadas en los ensayos de centrifugación con PET

Ensayo	Programa centrifugación	Sobrenadante	Resuspensión
1	1.2	$1,85 \times 10^8 \text{ L}^{-1}$	-
	2	$2,25 \times 10^7 \text{ L}^{-1}$	$4,56 \times 10^7 \text{ L}^{-1}$
2	1.3	$2,10 \times 10^8 \text{ L}^{-1}$	-
	2	$1,85 \times 10^7 \text{ L}^{-1}$	$2,65 \times 10^7 \text{ L}^{-1}$

La fracción de partículas menores de 3 y 2 μm y mayores de 1 μm , aisladas en el fondo del tubo con el programa de centrifugación 2, se resuspendieron en 5 mL de agua ultrapura, midiéndose la concentración de las suspensiones obtenidas para evaluar la capacidad de recuperación de dicha fracción. A la vista de los resultados de la tabla 8, se obtuvo una recuperación del 29% para las partículas del ensayo 1, similar a la recuperación que se obtuvo para la centrifugación de PVC; mientras que para las partículas del ensayo 2, se obtuvo una recuperación del 14%. Esta menor recuperación puede deberse a la capacidad de detección del detector, que provoca que la distribución normal aparezca sesgada.

5.CONCLUSIONES

Hoy en día, no existe una técnica analítica que permita detectar y cuantificar adecuadamente todos los microplásticos, por lo que se usa combinaciones de varias técnicas. Este trabajo se ha centrado en el desarrollo de dos métodos analíticos para la caracterización y cuantificación de microplásticos mediante la técnica de análisis dinámico de imágenes. Tras la optimización de parámetros, tanto para la determinación de tamaño de partícula como para la concentración en número de partículas, se obtuvieron las condiciones necesarias para una caracterización detallada de suspensiones de microplásticos. Los resultados obtenidos permiten la determinación directa del tamaño de partícula; mientras que la determinación de concentraciones en número requiere una calibración con patrones de concentración conocida, ya que no todas las partículas introducidas en el instrumento pueden ser detectadas, por lo que la técnica DIA no puede considerarse una técnica absoluta para la determinación de concentraciones.

Para obtener unos resultados fiables, se realizaron las correspondientes validaciones a partir de patrones certificados de poliestireno. Una vez obtenidas las prestaciones analíticas, se observa que la técnica DIA permite determinar el tamaño de partícula con una buena precisión y veracidad. En general, DIA se trata de una técnica sencilla que puede ser empleada en combinación con otras técnicas, ofreciendo así resultados más detallados acerca de los microplásticos.

Por último, se consiguió preparar y caracterizar suspensiones de microplásticos de PVC y PET gracias a la técnica DIA. Mediante centrifugación se logró el fraccionamiento de partículas en el rango de micrómetros con formas irregulares, en línea con los microplásticos que pueden encontrarse en el medio ambiente. Por tanto, estas suspensiones de microplásticos y la metodología de preparación pueden ser útiles en futuras investigaciones relacionadas con estos materiales.

BIBLIOGRAFÍA

- (1) Ali, N.; Liu, W.; Zeb, A.; Shi, R.; Lian, Y.; Wang, Q.; Wang, J.; Li, J.; Zheng, Z.; Liu, J.; Yu, M.; Liu, J. Environmental Fate, Aging, Toxicity and Potential Remediation Strategies of Microplastics in Soil Environment: Current Progress and Future Perspectives. *Science of the Total Environment*. Elsevier B.V. January 1, 2024. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2023.167785>.
- (2) De, R.; Comisión, L. A. I (Resoluciones, Recomendaciones y Dictámenes) COMISIÓN EUROPEA. <https://doi.org/10.2788/36237>.
- (3) Zambrano-Pinto, M. V.; Tinizaray-Castillo, R.; Riera, M. A.; Maddela, N. R.; Luque, R.; Díaz, J. M. R. Microplastics as Vectors of Other Contaminants: Analytical Determination Techniques and Remediation Methods. *Science of the Total Environment*. Elsevier B.V. January 15, 2024. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2023.168244>.
- (4) Musa, I. O.; Auta, H. S.; Ilyasu, U. S.; Aransiola, S. A.; Makun, H. A.; Adabara, N. U.; Abioye, O. P.; Aziz, A.; Jayanthi, B.; Maddela, N. R.; Prasad, R. Micro- and Nanoplastics in Environment: Degradation, Detection, and Ecological Impact. *International Journal of Environmental Research*. Springer Science and Business Media Deutschland GmbH February 1, 2024. <https://doi.org/10.1007/s41742-023-00551-9>.
- (5) Taulbee, D. N.; Maroto-Valer, M. *Centrifugation Encyclopedia of Separation Science*; 2000. <https://doi.org/10.1016/b0-12-226770-2/00011-9>.
- (6) Liu, Y.; Lin, Y.; Xie, J.; Li, P.; Zhou, Y.; Wang, P.; Wu, Y. A Method to Replace NaCl as a Flotation Solution for Extracting MPs in Soil: A Case Study of the Jiaxing Agricultural Soil from China. *Bull Environ Contam Toxicol* **2023**, *110* (5). <https://doi.org/10.1007/s00128-023-03726-4>.
- (7) Prakash, R.; Majumder, S. K.; Singh, A. Flotation Technique: Its Mechanisms and Design Parameters. *Chemical Engineering and Processing - Process Intensification*. Elsevier B.V. May 1, 2018, pp 249–270. <https://doi.org/10.1016/j.cep.2018.03.029>.
- (8) Merkus, H. G. Microscopy and Image Analysis. In *Particle Size Measurements*; Springer Netherlands: Dordrecht, 2009; pp 195–217. https://doi.org/10.1007/978-1-4020-9016-5_7.
- (9) Vitali, C.; Peters, R. J. B.; Janssen, H. G.; Nielen, M. W. F.; Ruggeri, F. S. Microplastics and Nanoplastics in Food, Water, and Beverages, Part II. Methods. *TrAC - Trends in Analytical Chemistry*. Elsevier B.V. December 1, 2022. <https://doi.org/10.1016/j.trac.2022.116819>.
- (10) Fu, W.; Min, J.; Jiang, W.; Li, Y.; Zhang, W. Separation, Characterization and Identification of Microplastics and Nanoplastics in the Environment. *Science of the Total Environment* **2020**, *721*. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.137561>.
- (11) Peñalver, R.; Arroyo-Manzanares, N.; López-García, I.; Hernández-Córdoba, M. An Overview of Microplastics Characterization by Thermal Analysis. *Chemosphere*. Elsevier Ltd March 1, 2020. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2019.125170>.
- (12) Schwaferts, C.; Niessner, R.; Elsner, M.; Ivleva, N. P. Methods for the Analysis of Submicrometer- and Nanoplastic Particles in the Environment. *TrAC - Trends in Analytical Chemistry*. Elsevier B.V. March 1, 2019, pp 52–65. <https://doi.org/10.1016/j.trac.2018.12.014>.
- (13) Athulya, P. A.; Chandrasekaran, N. Interactions of Natural Colloids with Microplastics in Aquatic Environment and Its Impact on FTIR Characterization of Polyethylene and Polystyrene Microplastics. *J Mol Liq* **2023**, *369*. <https://doi.org/10.1016/j.molliq.2022.120950>.

- (14) Ivleva, N. P. Chemical Analysis of Microplastics and Nanoplastics: Challenges, Advanced Methods, and Perspectives. *Chemical Reviews*. American Chemical Society October 13, 2021, pp 11886–11936. <https://doi.org/10.1021/acs.chemrev.1c00178>.
- (15) Goedecke, C.; Dittmann, D.; Eisentraut, P.; Wiesner, Y.; Schartel, B.; Klack, P.; Braun, U. Evaluation of Thermoanalytical Methods Equipped with Evolved Gas Analysis for the Detection of Microplastic in Environmental Samples. *J Anal Appl Pyrolysis* **2020**, *152*. <https://doi.org/10.1016/j.jaap.2020.104961>.
- (16) Trujillo, C.; Pérez-Arantegui, J.; Lobinski, R.; Laborda, F. Improving the Detectability of Microplastics in River Waters by Single Particle Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry. *Nanomaterials* **2023**, *13* (10), 1–16. <https://doi.org/10.3390/nano13101582>.
- (17) Goenaga-Infante, H.; Bartczak, D. Single Particle Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry (SpICP-MS). In *Characterization of Nanoparticles: Measurement Processes for Nanoparticles*; Elsevier, 2019; pp 65–77. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-814182-3.00003-1>.
- (18) Taquía Gutiérrez, J. A. El Procesamiento de Imágenes y Su Potencial. Aplicación En Empresas Con Estrategia Digital. *Interfases* **2017**, *nº 10* (1993–4912), 11–29.
- (19) Ranville, J.; Montano, M. D. Size Distributions. In *Frontiers of Nanoscience*; Elsevier Ltd, 2015; Vol. 8, pp 91–121. <https://doi.org/10.1016/B978-0-08-099948-7.00003-8>.
- (20) ISO/IEC 17025:2005. Requisitos Generales Para La Competencia de Los Laboratorios de Ensayo y Calibración. 2005.
- (21) Eurolab España. P. P. Morillas y colaboradores. *The Fitness for Purpose of Analytical Methods : A Laboratory Guide to Method Validation and Related Topics*, 1ª.; 2006.
- (22) Beltrán, M.; Marcilla, A. *Tecnología de Polímeros. Procesado y Propiedades*; Alicante, 2012.
- (23) Clarke, P. *Theory of Sedimentation and Centrifugation*; 2009.
- (24) Schnepf, U.; von Moers-Meßmer, M. A. L.; Brümmer, F. A Practical Primer for Image-Based Particle Measurements in Microplastic Research. *Microplastics and Nanoplastics* **2023**, *3* (1). <https://doi.org/10.1186/s43591-023-00064-4>.

ANEXOS

ANEXO 1. INFORMES DE LOS MATERIALES DE PARTIDA DE PVC Y PET PROCEDENTES DE UN MOLIDO CRIOGÉNICO

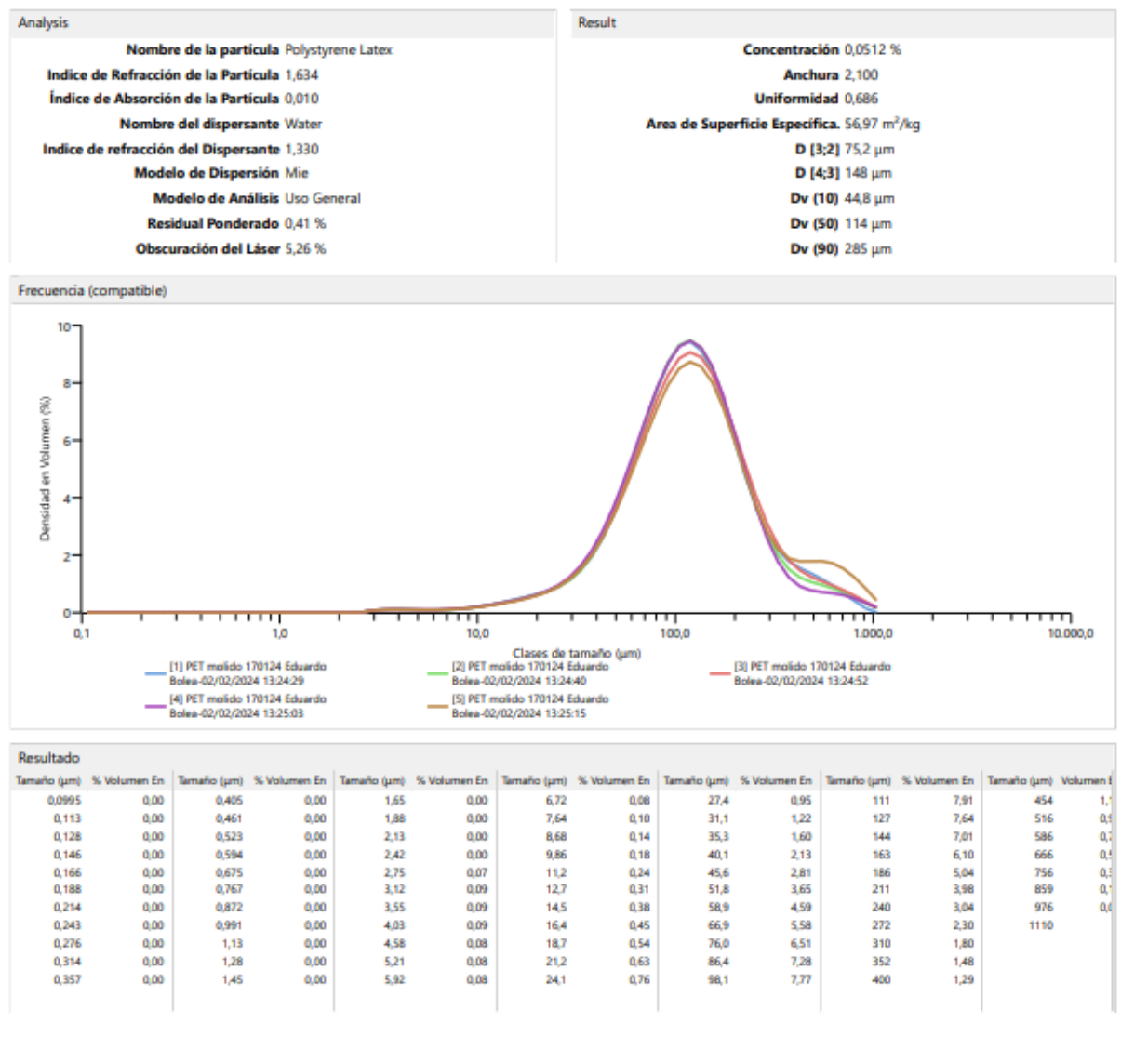


Figura A1.1. Informe correspondiente al material de PET obtenido por molido criogénico.

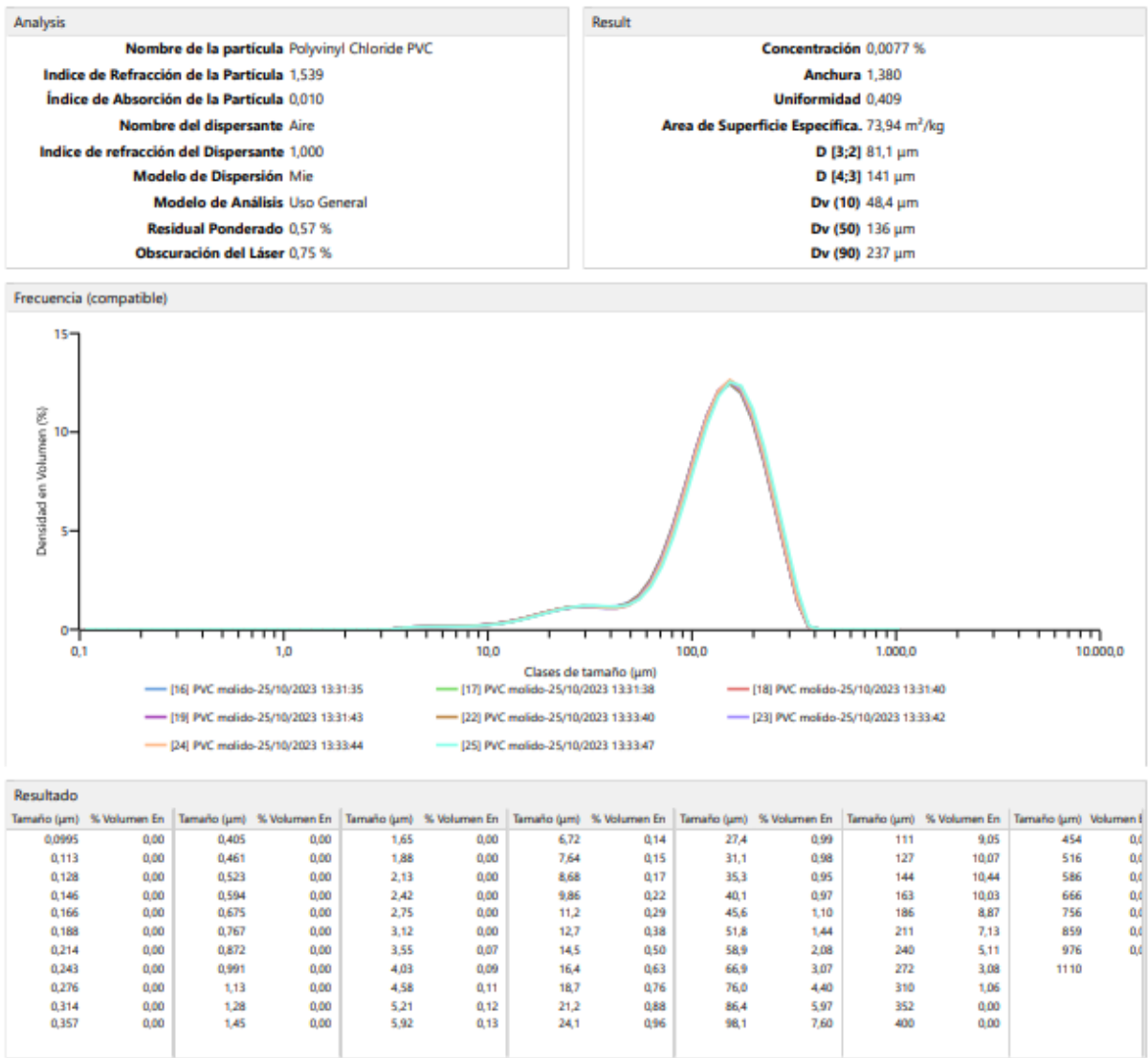


Figura A1.2. Informe correspondiente al material de PVC obtenido por molido criogénico.

ANEXO 2. TEST T PARA LA COMPARACIÓN DE DIÁMETROS EN LA OPTIMIZACIÓN

Tabla A2.1. Hojas de cálculo para el desarrollo del test t de los diferentes patrones de Thermo y Sigma

Medidas experimentales			Valor real		Test t			
Thres: 98 Noise: 0 Sharp: 2000			Media	5,000				
			Desvest	0,042				
Vídeo	Tamaño	Desviación	Realizamos un test t para comparar el valor medio con el valor real.			media	5,00232	
1	4,8865	0,90263				desvest	0,06697553	
2	5,0071	0,89472				var	0,0044857	
3	5,0437	0,89466				n	5	
4	5,0236	0,87205				gr.l	4	
5	5,0507	0,87917				P, ref	0,05	
Media	5,00232	0,888646	t exp	0,07745631		t crit	2,77644511	
Desvest	0,06697553	0,01258805					t exp < t crit	
%	1,33888941	1,41654237						
Medidas experimentales			Valor real		Test t			
Thres: 98 Noise: 0 Sharp: 2000			Media	4,000				
			Desvest	0,043				
Vídeo	Tamaño	Desviación	Realizamos un test t para comparar el valor medio con el valor real.			media	4,15416667	
1	4,1805	1,3688				desvest	0,02486148	
2	4,1311	1,2147				var	0,0006181	
3	4,1509	0,92195				n	3	
						gr.l	2	
						P, ref	0,05	
Media	4,15416667	1,16848333	t exp	10,7404896		t crit	4,30265273	
Desvest	0,02486148	0,22698175					t exp > t crit	
%	0,598471	19,4253307						
Medidas experimentales			Valor real		Test t			
Thres: 98 Noise: 0 Sharp: 2000			Media	2,940				
			Desvest	0,06				
Vídeo	Tamaño	Desviación	Realizamos un test t para comparar el valor medio con el valor real.			media	3,1148	
1	3,114	0,49676				desvest	0,00773111	
2	3,1229	0,43669				var	5,977E-05	
3	3,1075	0,4518				n	3	
						gr.l	2	
						P, ref	0,05	
Media	3,1148	0,46175	t exp	39,1616001		t crit	4,30265273	
Desvest	0,00773111	0,03124665					t exp > t crit	
%	0,24820553	6,76700583						

El t crítico será de dos colas porque se quiere comprobar si el valor medio es válido o no. Como en el caso del patrón de 5 μ m (empleado para hacer la optimización) t experimental es menor que t crítico, se puede decir que no son significativamente distintos, por tanto, se podría considerar que las condiciones óptimas son válidas.

ANEXO 3. PARÁMETROS ANALÍTICOS DE LA VALIDACIÓN DEL MÉTODO

A3.1. Límite de detección y límite de cuantificación

Tabla A3.1. Hojas de cálculo para determinar el límite de detección y cuantificación

Pendientes	Ordenadas
2,04E-05	2,24E+02
1,80E-05	-2,18E+01
2,69E-05	3,04E+02

Blancos
7
12
13
10
15
6
10
6
8
11

Media	2,18E-05	1,83E+02
Desviación	4,60471E-06	145,448369
DSR	21,15485943	79,3657773

Media	9,8
Desviación	3,04776785
DSR	31,099672

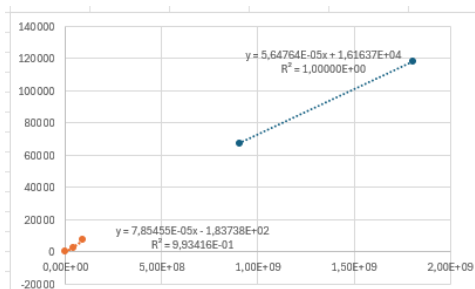
LOD	4,31E+05
LOQ	1,44E+06

Para obtener la pendiente de la recta, se hizo el promedio de las pendientes de las rectas obtenidas a lo largo de varios días, y se hizo el promedio de 10 blancos de agua ultrapura. Para calcular los límites de detección y cuantificación, se aplicaron las ecuaciones (4) y (5).

A3.2. Intervalo de trabajo

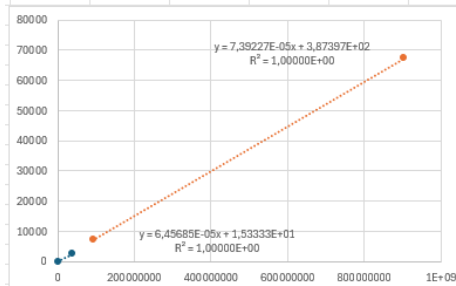
Tabla A3.2. Hojas de cálculo del análisis de la regresión para la comparación de pendientes y eliminar puntos anómalos

Resumen									
Estadísticas de la regresión									
Coefficiente d	0,99781904								
Coefficiente d	0,99564284								
R ² ajustado	0,99419046								
Error típico	3986,79632								
Observaciones	5								
ANÁLISIS DE VARIANZA									
	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Media Cuadrado	F	Valor crítico de F				
Regresión	1	1,0896E+10	1,0896E+10	685,5224	0,00012223				
Residuos	3	47683634,6	15894544,9						
Total	4	1,0944E+10							
	Coefficientes	Error típico	Estadístico t	Probabilidad	Inferior 95%	Superior 95%	Inferior 95,0%	Superior 95,0%	
Intercepción	1357,28236	2291,77311	0,59224116	0,59536064	-5936,1625	8650,72724	-5936,1625	8650,72724	
Variable X 1	6,6283E-05	2,5316E-06	26,1824827	0,00012223	5,8226E-05	7,4339E-05	5,8226E-05	7,4339E-05	
Análisis de los residuales									
Observación	Predicho para	Residuos	Residuos estandarizados						
1	1357,28236	-1341,949	-0,3886703	Como ninguno de los residuos estandarizados es mayor que 2, no hay puntos que tumben la recta. Sin embargo, hay que comprobar mediante la comparación de pendientes si hay algún punto que tenga un mayor peso y pueda tumbar la recta.					
2	3923,11189	-1408,3119	-0,407891						
3	7497,18889	-262,18889	-0,0759381						
4	61295,3212	5938,6788	1,72002657						
5	121214,429	-2926,229	-0,8475272						



Pend mayor/menor 1,39129796

Como la relación es mayor que 1,2, se quita el último punto.

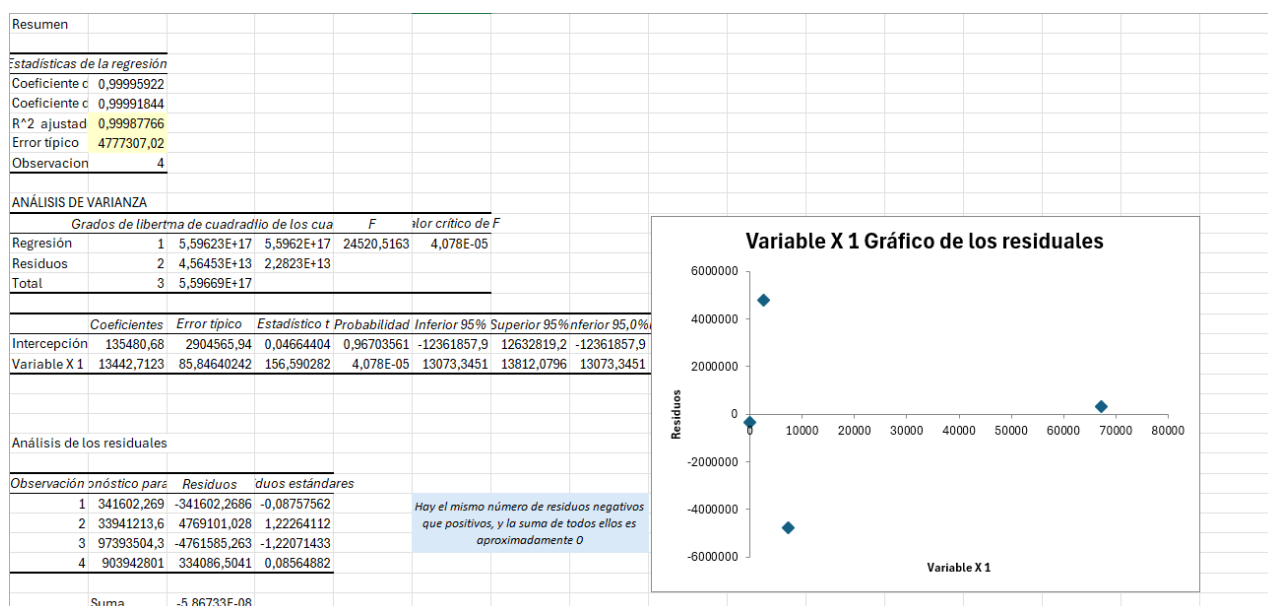


Pend mayor/menor 1,1448725

Como la relación es menor que 1,2 ya se tiene el rango lineal

En la tabla A3.2. se refleja el análisis de la regresión de la recta realizada con concentraciones entre 0 y $1,81 \times 10^9 \text{ L}^{-1}$. Se ha realizado una comparación de pendientes para determinar si hay algún punto que tenga un mayor peso y pueda tumbar la recta. Se concluye que el último punto puede ser eliminado ya que la relación de pendientes entre los puntos superiores y los inferiores es superior a 1,2.

Tabla A3.3. Hojas de cálculo del análisis de la regresión de la recta con un intervalo de trabajo lineal



En la tabla A3.3, a partir de la recta con el rango lineal delimitado, se estudió si se cumple la homocedasticidad mediante el análisis de los residuales, es decir, si los datos son aleatorios y no hay ninguna tendencia. Se observó que se cumple la condición de homocedasticidad y, por tanto, la recta de calibración se puede utilizar para cuantificar.

A3.3. Veracidad

Para el cálculo del sesgo se interpolaron disoluciones del patrón de 5 µm y 4 µm en la recta de calibrado de referencia obtenida con el patrón de 3 µm, indicado como concentración experimental. La concentración de referencia corresponde a la obtenida por pesada en la balanza.

Tabla A3.4. Hojas de cálculo para la determinación del sesgo para el patrón de 4 µm

Señal medida	9928	Sesgo	-1,64E+07
Conc. Referencia	4,93E+08	%	-3,33
Conc. Experimental	4,77E+08		

Tabla A3.5. Hojas de cálculo para la determinación del sesgo para el patrón de 5 µm

Señal medida	8045	Sesgo	1,38E+08
Conc. Referencia	2,46E+08	%	56,13
Conc. Experimental	3,84E+08		

A3.4. Precisión

Tabla A3.6. Hojas de cálculo de ANOVA de un factor para determinar la repetibilidad y la precisión intermedia con el patrón de 5 µm

Análisis de varianza de un factor					
RESUMEN					
Grupos	Cuenta	Suma	Promedio	Varianza	
Columna 1	6	83041	13840,1667	156002,167	
Columna 2	6	59943	9990,5	43657,1	
Columna 3	6	68089	11348,1667	89550,5667	
Columna 4	6	58332	9722	82778	
Columna 5	6	70668	11778	63868,8	
ANÁLISIS DE VARIANZA					
Entre grupos	Suma de los cuadrados	Libertad de los cuadrados	F	Probabilidad	Valor crítico para F
Entre grupos	65290372,2	4	16322593,1	187,247271	3,0354E-18 2,75871047
Dentro de los	2179283,17	25	87171,3267		
Total	67469655,4	29			

Desviación repetibilidad (sr)	295,247907
Variación total (si)	1644,96311
Precisión intermedia (st)	1671,24952

Para el cálculo de la desviación estándar de la repetibilidad (s_r) se ha empleado la ecuación (A1); y para la precisión intermedia (s_i), la ecuación (A3).

$$s_r = \sqrt{MS_i} \quad (A1)$$

$$s_i = \sqrt{\frac{MS_e - MS_i}{n}} \quad (A2)$$

$$s_I = \sqrt{s_r^2 + s_i^2} \quad (A3)$$

El límite de repetibilidad se calcula como:

$$r = \sqrt{2} \times t \times s_r \quad (A4)$$

siendo t la t de Student a dos colas.

También se calculó la repetibilidad y la precisión intermedia para los patrones de 4 y 3 µm.

Tabla A3.7. Hojas de cálculo de ANOVA de un factor para determinar la repetibilidad y la precisión intermedia con el patrón de 3 µm

Análisis de varianza de un factor					
RESUMEN					
Grupos	Cuenta	Suma	Promedio	Varianza	
Columna 1	5	19566	3913,2	29377,7	
Columna 2	5	15294,4913	3058,89825	2992,71684	
Columna 3	5	20788,8472	4157,76944	110056,96	
ANÁLISIS DE VARIANZA					
Entre grupos	Suma de los cuadrados	Libertad de los cuadrados	F	Probabilidad	Valor crítico para F
Entre grupos	3328605,95	2	1664302,97	35,0558231	9,7422E-06 3,88529383
Dentro de los	569709,506	12	47475,7921		
Total	3898315,45	14			

Desviación repetibilidad (sr)	217,889403
Variación total (si)	568,652298
Precisión intermedia (st)	608,967346

Tabla A3.8. Hojas de cálculo de ANOVA de un factor para determinar la repetibilidad y la precisión intermedia con el patrón de 4 μm

Análisis de varianza de un factor									
RESUMEN									
Grupos	Cuenta	Suma	Promedio	Varianza					
Columna 1	5	118733	23746,6	6253488,8					
Columna 2	5	112812	22562,4	3851247,3					
Columna 3	5	66458,6797	13291,7359	83651,4662					
ANÁLISIS DE VARIANZA									
n de las variacna de cuadrados de libertio de los cua		F		Probabilidad' or crítico para F		Desvest repetibilidad (sr)		1842,85897	
Entre grupos	327752874	2	163876437	48,2538879	1,8295E-06	3,88529383	Variación total (si)		5665,33861
Dentro de los	40753550,3	12	3396129,19			Precisión intermedia (si)		5957,53227	
Total	368506425	14							

ANEXO 4. CÁLCULOS CORRESPONDIENTES A LOS PROGRAMAS DE CENTRIFUGACIÓN

La centrifugación es una técnica que permite separar los distintos componentes de una muestra en función de sus densidades y/o tamaños gracias a la aplicación de una fuerza centrífuga. Uno de los componentes fundamentales de las centrifugadoras es la presencia de un rotor, que puede ser angular, vertical u oscilante. En este trabajo se empleó el rotor oscilante, el cual permite que los tubos se coloquen de manera horizontal proporcionando a las partículas un mayor recorrido, lo que permite una mejor separación.

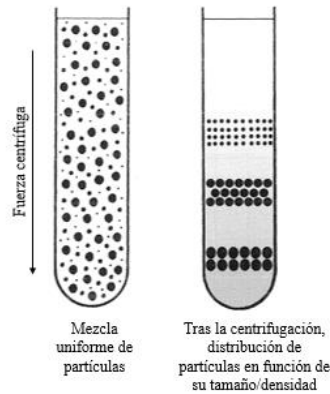


Figura A4.1. Centrifugación por diferencia de tamaños en una suspensión de partículas

En una suspensión de partículas sometida a centrifugación, hay tres fuerzas que actúan sobre ellas: la fuerza centrífuga, F_C ; la fuerza de flotabilidad, F_B (los fluidos ejercen una fuerza sobre las partículas sumergidas en ellos según el Principio de Arquímedes) y la fuerza de arrastre viscoso, F_D (debido a la viscosidad del fluido, las partículas que se muevan van a soportar una fuerza que se opone a su movimiento). De esta manera, al hacer girar las muestras, las partículas suspendidas viajarán al fondo del tubo en función de su tamaño y/o densidad.²³ Las partículas de mayor tamaño/densidad migrarán más rápido al fondo del tubo respecto a las de menor tamaño/densidad.

Si consideramos las partículas como esferas:

$$F_C = m\omega^2 r = \frac{4}{3} \pi r_p^3 \rho_p \omega^2 r \quad (A5)$$

$$F_B = \frac{4}{3} \pi r_p^3 \rho_m \omega^2 r \quad (A6)$$

$$F_D = 6 \pi r \eta v \quad (A7)$$

Sabiendo que la fuerza de flotabilidad y la fuerza de arrastre viscoso se oponen a la fuerza centrífuga, se equiparan todas las fuerzas y, como velocidad es distancia recorrida entre tiempo, se obtiene el tiempo necesario para que las partículas de un determinado tamaño migren al fondo del tubo:

$$t = \frac{18 \eta}{d^2 (\rho_P - \rho_M) \omega^2} \ln\left(\frac{x_1}{x_2}\right) \quad (A8)$$



Figura A4.2. Tubo de centrifugación en rotor oscilante.

ANEXO 5. DISTRIBUCIONES DE DIÁMETROS EQUIVALENTES PARA LA COMPARACIÓN DE TÉCNICAS.

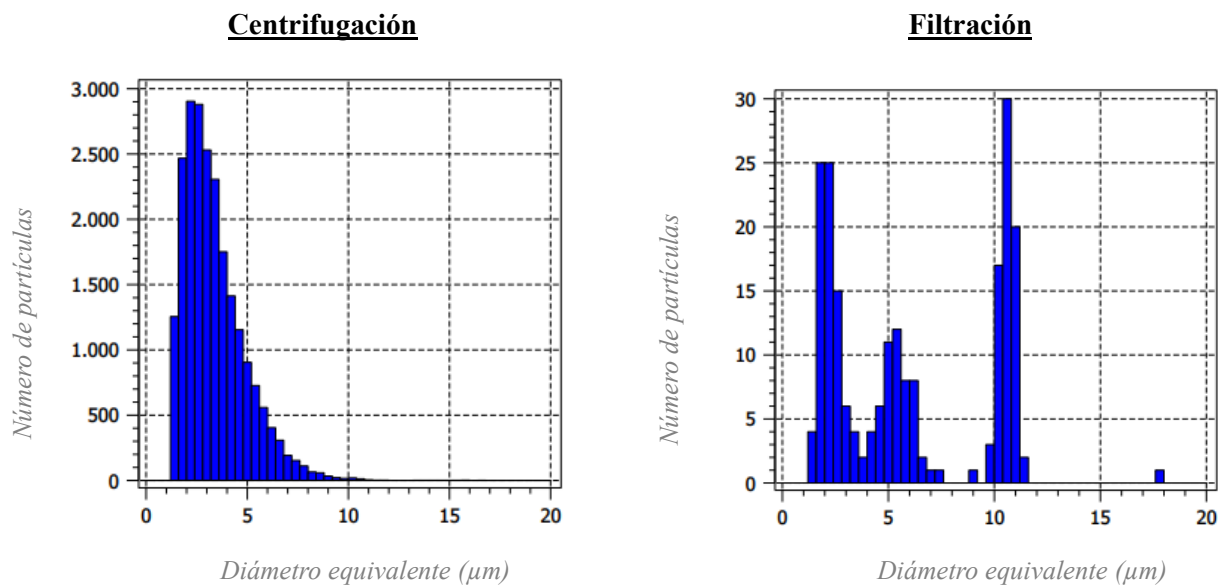


Figura A5.1. A la izquierda, histograma del número de partículas en función de su diámetro equivalente para la técnica de centrifugación. A la derecha, histograma correspondiente al número de partículas en función de su diámetro equivalente para la técnica de filtración.

Se observa que, para la técnica de centrifugación, se ha obtenido un fraccionamiento eficaz de aquellas partículas inferiores a 10 μm , mientras que para la filtración se observa la presencia de partículas superiores a 10 μm , y, por lo tanto, no se ha conseguido el objetivo que consistía en el fraccionamiento de partículas inferiores a 10 μm .

ANEXO 6. DISTRIBUCIÓN DE TAMAÑOS EN EL ANÁLISIS DE LAS SUSPENSIONES DE MICROPLÁSTICOS DE PVC Y PET

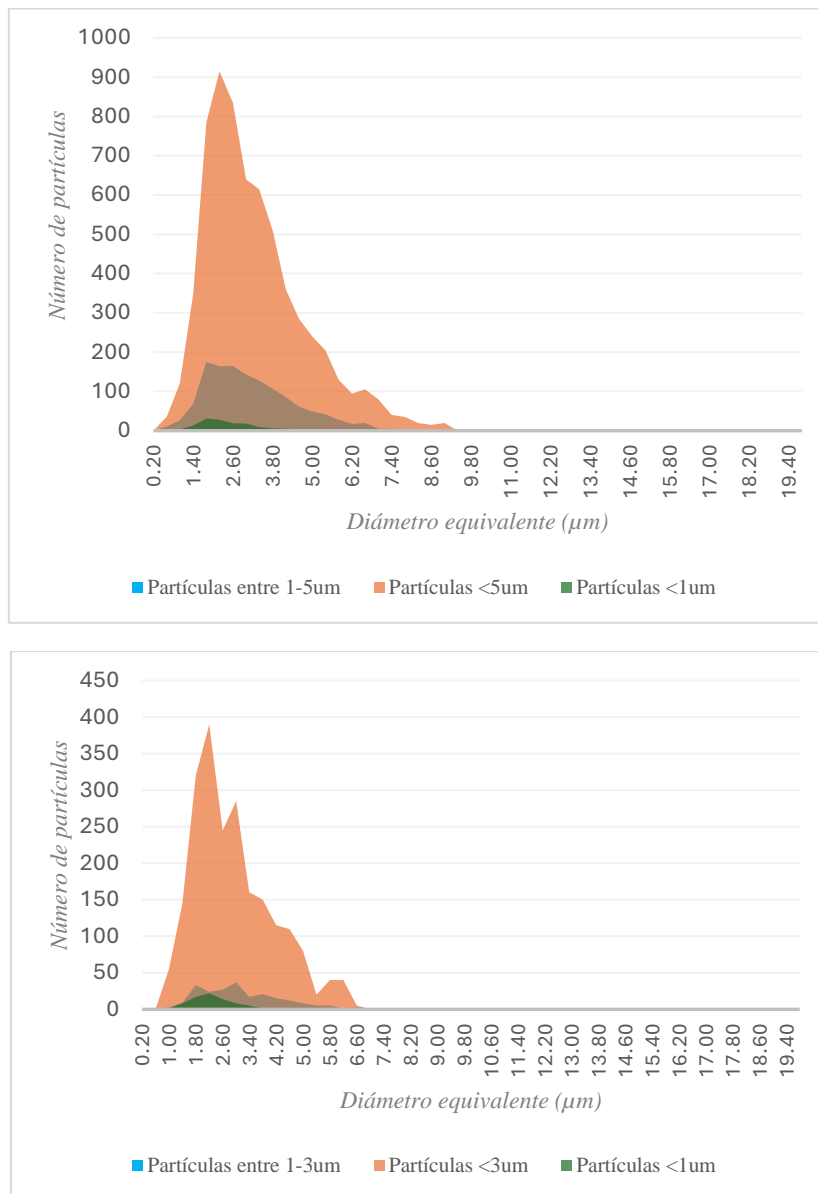


Figura A6.1. Histogramas de distribuciones de diámetro equivalente en el ensayo de centrifugación de PVC. Arriba, correspondiente al fraccionamiento de partículas inferiores a 5 μm empleando el programa 1.1; abajo, correspondiente al fraccionamiento de partículas inferiores a 3 μm empleando el programa 1.2.

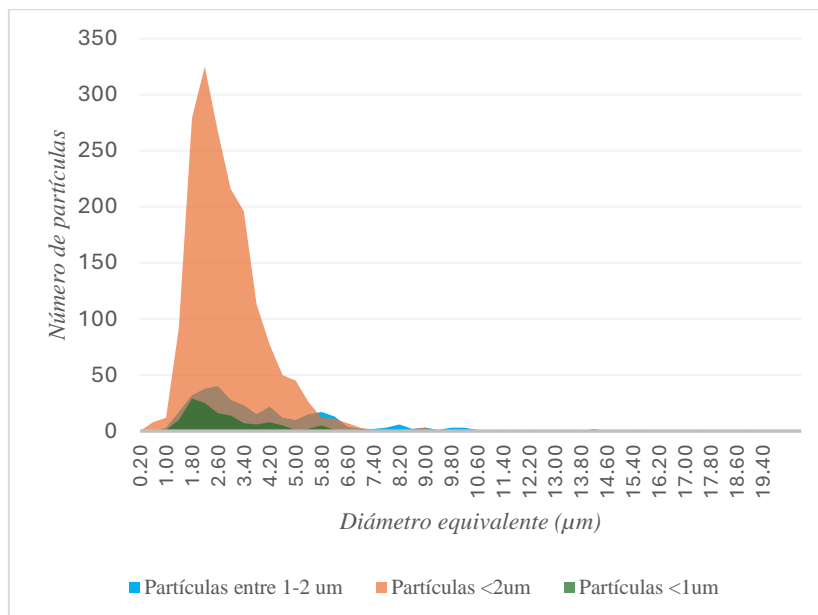
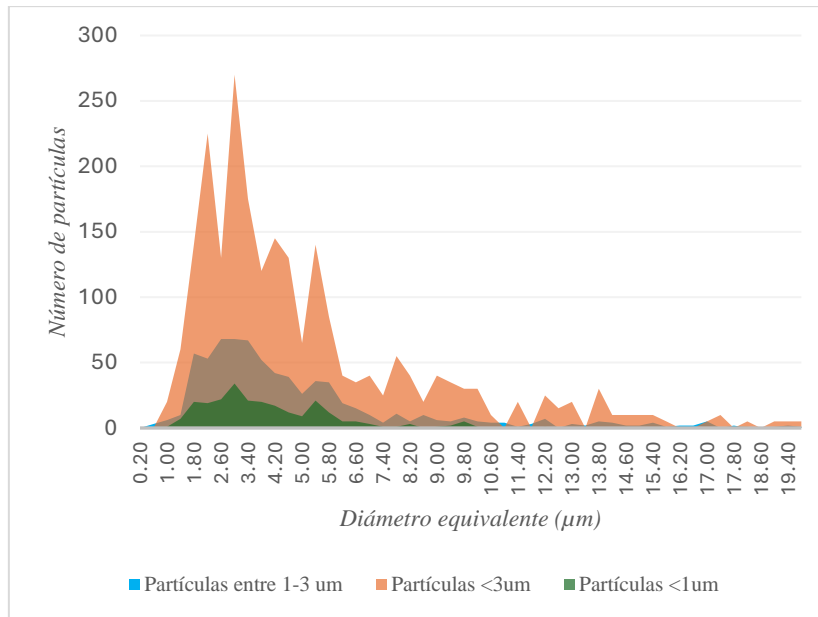


Figura A6.2. Histogramas de distribuciones de diámetro equivalente en el ensayo de centrifugación de PET. Arriba, correspondiente al fraccionamiento de partículas inferiores a 3 µm empleando el programa 1.2; abajo, correspondiente al fraccionamiento de partículas inferiores a 2 µm empleando el programa 1.3.