

**EXTRACCIÓN MEDIANTE PUNTO DE NUBE Y DETECCIÓN MEDIANTE
TÉCNICAS DE FLUORESCENCIA MOLECULAR APLICADAS A LA
CARACTERIZACIÓN DE MICROPLÁSTICOS**

*CLOUD POINT EXTRACTION AND DETECTION BY MOLECULAR FLUORESCENCE
APPLIED TO THE CHARACTERIZATION OF MICROPLASTICS*

TRABAJO FIN DE GRADO

MARTA CUBERO MOLINER

Director: Eduardo Bolea Morales

Departamento de Química Analítica, Universidad de Zaragoza

Grupo de Espectroscopía Analítica y Sensores (GEAS)



Julio 2023

RESUMEN

El auge de la utilización de plásticos ha generado una gran cantidad de residuos que se encuentran dispersos en numerosos entornos naturales. El problema no solo está en los plásticos macroscópicos, sino que éstos pueden degradarse formando partículas de microplásticos, e incluso nanoplásticos. Este hecho ha generado muchas preguntas respecto al riesgo que puede suponer, tanto para el medio ambiente como para los seres humanos. Para definir el riesgo y poder tomar medidas, es necesario disponer de métodos analíticos fiables para su detección, identificación y cuantificación.

Este trabajo ha consistido en primer lugar, en recopilar información de actualidad respecto a las técnicas y procedimientos disponibles para el análisis de micro- y nanoplásticos, tanto en muestras de laboratorio como en muestras reales complejas.

En segundo lugar, se ha realizado un estudio sobre la optimización de un procedimiento experimental para la identificación y cuantificación de micro- y nanoplásticos (utilizando partículas de poliestireno como modelo) mediante su extracción en punto de nube con un tensoactivo, y posterior detección utilizando las propiedades fluorescentes del Rojo Nilo (tinte orgánico fluorescente) mediante fluorescencia molecular. El método desarrollado permite la extracción completa de las micropartículas de poliestireno y su posterior cuantificación a partir de la disminución que generan sobre la señal fluorescente del Rojo Nilo en el extracto. Se han estudiado las prestaciones analíticas del método, que requiere el uso de la adición estándar y el control de diferentes parámetros (tiempo, exposición a la luz ambiental) para reducir su irreproducibilidad.

ABSTRACT

The plastics use's growth has produced a great number of residues that are widespread in the environment. The main concern is not only about the macroscopic plastics, but the micro- and nanoplastics that result from break down processes. This fact has generated several questions about the risks for the environment and humans. This risk assessment requires the development of reliable analytical methods for its detection, identification and quantification.

At first, this work has consisted in the compilation of current information about techniques and procedures available for micro- and nanoplastics analysis both in laboratory and complex real samples.

Secondly, a study has been carried out on the optimization of an experimental procedure for the identification and quantification of micro- and nanoplastics (using polystyrene particles as model) by cloud-point extraction with a surfactant and subsequent detection using the fluorescent properties of Red Nile (fluorescent organic dye) by molecular fluorescence. The method developed allows the complete extraction of the polystyrene particles and their quantification by measuring the signal reduction caused on Red Nile fluorescence in the extract. The analytical properties of the method have been studied. It requires the use of standard addition and the control of different parameters (such as measuring time, light exposure) to reduce the irreproducibility of the measurements.

ABREVIATURAS

PS – *Poliestireno*

PS(Flu) – *Poliestireno con fluoróforo*

TX-67 – *Tritón X 67*

TX-100 – *Tritón X 100*

TX-114 – *Tritón X 114*

RN – *Rojo Nilo*

CPE – *Cloud Point Extraction (extracción en punto de nube)*

Py-GC/MS – *Pirólisis acoplada con cromatografía de gases-espectrometría de masas*

μ -FTIR – *Espectroscopía infrarroja con transformada de Fourier, combinada con microscopía*

μ -Raman – *Espectroscopía Raman, combinada con microscopía*

PMMA – *Polimetilmetacrilato*

PE – *Polietileno*

PP – *Polipropileno*

PC – *Policarbonato*

PU – *Poliuretano*

EVA – *Poli (etileno acetato de vinilo)*

PVC – *Cloruro de polivinilo*

PA – *Poliamida*

PES - *Poliéster*

ÍNDICE

1. INTRODUCCIÓN / ANTECEDENTES	1
1.1. Presencia de micro/nanoplásticos en el medioambiente. Problemas asociados	1
1.2. Detección de microplásticos. Técnicas comúnmente utilizadas para su caracterización	2
1.3. Métodos de separación de microplásticos. Extracción en punto de nube	3
1.4. Estrategias para la tinción de microplásticos. Uso de Rojo Nilo. Propiedades fluorescentes	3
2. OBJETIVOS Y PLANTEAMIENTO DEL TRABAJO	5
3. PARTE EXPERIMENTAL	6
3.1. Instrumentación	6
3.2. Material de laboratorio	6
3.3. Reactivos	6
3.3.1. Estándares de poliestireno	6
3.3.2. Extracción en punto de nube	6
3.3.3. Reactivo fluorescente	6
3.4. Preparación de disoluciones	6
3.5. Procedimientos	7
3.5.1. Extracción en punto de nube (CPE)	7
3.5.2. Análisis mediante fluorescencia molecular	7
4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	8
4.1. Obtención del espectro de excitación y emisión del PS fluorescente	8
4.1.1. Optimizaciones con PS fluorescente	8
4.2. Extracción en punto de nube (CPE). Optimización de las condiciones de extracción	10
4.2.1. Rendimiento de extracción mediante medida de fluorescencia del PS fluorescente	11
4.3. Estudios previos con Rojo Nilo	11
4.3.1. Optimización de las condiciones para la extracción y medida de PS con Rojo Nilo	11
4.4. Determinación de la concentración de PS mediante CPE y medida de fluorescencia con Rojo Nilo	12
4.4.1. Determinación de PS mediante la variación de la intensidad fluorescente del RN	13
4.4.2. Determinación mediante adición estándar	15
4.4.3. Prestaciones analíticas del procedimiento desarrollado	16
4.4.3.1. Estudio de las variables que afectan a la precisión	16
4.4.3.2. Evaluación de la exactitud del procedimiento optimizado	17
4.4.3.3. Evaluación de la selectividad frente a otras micropartículas. Ensayo con partículas de óxido de silicio	18
5. CONCLUSIONES	21
BIBLIOGRAFÍA	22
ANEXOS	24

1. INTRODUCCIÓN / ANTECEDENTES

1.1. Presencia de micro/nanoplásticos en el medioambiente. Problemas asociados

Los plásticos, término que la comunidad científica ha adoptado para referirse a todos los polímeros sintéticos¹, sirven como materiales versátiles y maleables que permiten acceder a una amplia gama de propiedades químicas y físicas. Además, sus bajos costes de producción y procesamiento facilitan a los fabricantes su manipulación para desarrollar nuevos productos que benefician a la sociedad; las industrias de muchos sectores utilizan plásticos en alguna etapa de su producción o lo incluyen en los productos finales².

Solo en Europa, la demanda de plásticos en 2018 llegó a 51,2 millones de toneladas². La producción mundial de plástico no ha parado de crecer, alcanzando los 380 millones de toneladas anuales en ese mismo año, con una previsión de triplicar esta cifra en el 2050². La creciente producción implica un aumento de los residuos plásticos, promoviendo en consecuencia su acumulación en el medio ambiente. Además, la falta de estrategias e infraestructuras de eliminación adecuadas, han creado grandes áreas de desechos flotantes en los océanos, la llamada “sopa de plástico”². La degradación de objetos plásticos macroscópicos (< 5mm) en piezas más pequeñas, normalmente se produce por una combinación de procesos químicos y físicos que, en particular, pueden implicar fotodegradación, oxidación, degradación hidrolítica y desintegración mecánica. Estos procesos se conocen como “meteorización”¹ y, dependiendo del tipo de polímero y su morfología, pueden diferir significativamente.

Las piezas de plástico degradadas forman una colección muy heterogénea, que varía en tamaño, forma y densidad, así como la composición química específica del material¹. La definición exacta de los micro- y nanoplásticos difiere, pero generalmente se acepta el término “nanoplásticos” para partículas menores a 1 µm, y “microplásticos” para partículas entre 1µm y 1mm³. Además, tanto nano- como microplásticos, se pueden clasificar según su origen como “primarios” (se fabrican directamente de su tamaño y forma para gran variedad de aplicaciones, como gránulos para producción industrial) o “secundarios” (se forman a través de la meteorización de desechos plásticos en el medio ambiente)³.

En la década de 1970, las primeras partículas de plástico pequeñas (< 5mm) fueron detectadas en aguas abiertas¹. En esa misma década, los científicos teorizaron por primera vez sobre las consecuencias ambientales de los plásticos y la amenaza que supone para la salud humana². La presencia de microplásticos se extiende a todo el planeta, desde el ecuador hasta los polos, y desde el fondo marino hasta el monte Everest (donde se encontraron fibras de poliéster a 8444 m)^{3,4}.

La interacción de los nanoplásticos con el medio ambiente y los organismos suponen una preocupación. Los impactos potencialmente negativos en la biota pueden asociarse con la lixiviación de monómeros y aditivos, algunos de los cuales han demostrado ser tóxicos, cancerígenos o disruptores endocrinos³. Además, pueden formarse y liberarse compuestos volátiles orgánicos (VOCs) debido a la fotodegradación oxidativa de desechos plásticos⁵. Es más, pueden absorber contaminantes orgánicos persistentes⁶ y metales tóxicos⁷ del medio ambiente, y actuar como vector de microorganismos patógenos y/o resistentes a antibióticos^{8,9}.

Es importante comprender la interacción de los nanoplásticos con el medio ambiente, especialmente con organismos vivos, para evaluar posibles riesgos sobre la salud, ya que los nanoplásticos pueden reaccionar de manera diferente a sus homólogos de tamaño micrométrico¹.

Las principales vías de exposición a los nanoplásticos son: inhalación, suele ocurrir por exposición laboral; absorción por la piel, a través del uso de productos de cuidado personal; o ingestión oral, siendo esta la principal, ya que se han encontrado microplásticos en varias especies de mariscos y en otros alimentos como la miel, cerveza, sal y azúcar, e incluso en agua potable^{1,2}. La absorción y acumulación de nanoplásticos, así como la transferencia a través de la cadena trófica de los organismos acuáticos, ha sido demostrada bajo condiciones experimentales, dando fuerza a la posibilidad de que los nanoplásticos podrían acumularse en la cadena alimentaria y, por lo tanto, resultar en la exposición humana^{10,11}. Un análisis reciente sobre la ingesta humana de microplásticos en alimentos arrojó una estimación de 39000-52000 partículas por año¹². Los datos disponibles en la literatura son difíciles de comparar, incompletos e insuficientes para una evaluación fiable de la ingesta de microplásticos². Para el estudio de los riesgos que suponen estos microplásticos, el primer paso es disponer de procedimientos de detección en diferentes entornos que sean fiables.

1.2. Detección de microplásticos. Técnicas comúnmente utilizadas para su caracterización

La detección fiable de microplásticos en muestras ambientales o matrices biológicas complejas presenta numerosas complicaciones, debido a su pequeño tamaño, su baja concentración y al hecho de que su composición química no es muy diferente de la materia orgánica. La detección de microplásticos, de acuerdo con su tamaño, no es suficiente, ya que se requiere adicionalmente su caracterización química para poder identificar las partículas¹.

En primer lugar, los métodos comunes para separar y concentrar micro- o nanoplásticos (nos referiremos a ellos como analitos) incluyen flotación, filtración y electroseparación, que se basan en las diferencias de densidad, tamaño, hidrofobicidad y conductividad eléctrica, respectivamente¹³.

En segundo lugar, para la detección y cuantificación de los analitos, encontramos principalmente métodos basados en espectrometría de masas (destructivos; Py-GC/MS) y métodos basados en partículas (no destructivos; μ -FTIR y μ -Raman)^{3,14}.

El método basado en masas más utilizado es Py-GC/MS (pirólisis acoplada con cromatografía de gases – espectrometría de masas). Primero se produce la degradación mediante pirólisis, después la separación por cromatografía gas y por último la identificación utilizando espectrometría de masas. Permite la determinación de: la masa polimérica; y la identificación y cuantificación de micro- y nanoplásticos en muestras ambientales complejas³. Su principal desventaja es que se trata de un método destructivo. Su principal ventaja es que permite la detección de algunos aditivos asociados a los plásticos y subproductos de degradación, lo que proporciona la información necesaria para que sea posible evaluar, de forma fiable, los riesgos que suponen los micro- y nanoplásticos para el medioambiente y para la salud humana³.

A modo de ejemplo, Ter Halle et al.¹⁵ recolectó muestras de agua del giro (corriente marina rotativa) del Atlántico Norte Subtropical. Después de la ultrafiltración del agua, utilizaron dispersión de luz dinámica (DLS) para comprobar la presencia de nanopartículas. Para evaluar la identidad química de las partículas, realizaron un análisis mediante Py-GC-MS. Estimaron que la señal de fracción coloidal del agua de mar podría atribuirse a una mezcla del 73±18% PVC, 18±16% PET y 9±10% PS³.

Los métodos basados en partículas más eficientes corresponden a espectroscopía vibracional: FTIR y Raman, ambos basados en la interacción de la radiación con las vibraciones moleculares, unidas a microscopía. Estos métodos permiten la identificación (tipo de polímero), la cuantificación (número,

tamaño / distribución de tamaños) y la caracterización (forma) de los microplásticos. La resolución espacial establecida para estos métodos viene determinada por el límite de difracción de la luz y, por tanto, limitada a 10 μm aproximadamente para $\mu\text{-FTIR}$ y 300 nm aproximadamente para $\mu\text{-Raman}$ ³. El principal inconveniente para $\mu\text{-FTIR}$ es la fuerte absorción que presenta el agua, por lo que requiere un minucioso secado de las muestras; mientras que para $\mu\text{-Raman}$, es que por lo general requiere más tiempo y, a menudo, sufre interferencia por fluorescencia. Por lo tanto, $\mu\text{-Raman}$ es aplicable para el análisis de microplásticos en todo el rango de tamaños (detectando más partículas en el mismo rango de tamaño que $\mu\text{-FTIR}$), pero su verdadero poder radica en el análisis de partículas más pequeñas de 10 μm , que no pueden ser evaluadas por técnicas convencionales de IR.

Por último, los métodos basados en masa son destructivos y proporcionan información sobre el contenido de algunos tipos de microplásticos y, por tanto, se pueden aplicar en estudios combinados después del análisis no destructivo, con el fin de lograr información complementaria (por ejemplo, información detallada sobre copolímeros, aditivos orgánicos y productos de meteorización, además de los datos sobre masas poliméricas)³.

1.3. Métodos de separación de microplásticos. Extracción en punto de nube

La extracción en punto de nube (CPE) es una técnica de preconcentración de muestra que se basa en la formación de micelas cuando un tensoactivo no iónico es calentado por encima de su punto de nube. Esta técnica ha sido muy utilizada para concentrar nanopartículas inorgánicas en matrices complejas, principalmente nanopartículas con recubrimientos hidrofóbicos, mostrando una ventaja significativa sobre los procedimientos de separación tradicionales, ya que es poco probable que éste modifique el tamaño y morfología original de las nanopartículas durante la extracción¹⁶.

La extracción en punto de nube ha resultado ser útil para la separación de micro- y nanoplásticos, ya que los plásticos presentan propiedades hidrofóbicas¹⁴. Liu J et. al.¹³ desarrolló un procedimiento para el aislamiento de micro- y nanoplásticos (principalmente <5 μm) en aguas ambientales, aplicado a esferas de PS y PMMA. Se utilizó filtración por membrana para separar y concentrar, mientras que se adoptó CPE para concentrar los nanoplásticos en el filtrado.

1.4. Estrategias para la tinción de microplásticos. Uso de Rojo Nilo. Propiedades fluorescentes

El Rojo Nilo (RN) es un reactivo fluorescente que detecta entornos hidrofóbicos y actualmente se utiliza como tinte para lípidos en células y para la detección de microplásticos mediante microscopía de epifluorescencia (fluorescencia acoplada a microscopio). Es soluble en agua y presenta propiedades solvatocrómicas (cambio de la posición y, a veces, intensidad de las bandas de absorción o emisión, provocado por un cambio en la polaridad del medio), siendo su fluorescencia mucho mayor en presencia de agentes hidrófobos. Este método de tinción ha sido eficaz para algunos plásticos (por ejemplo: PE, PP, PE, PC, PU y EVA), pero no funciona con PVC, PA ni PES.¹⁷

El uso del reactivo RN para la tinción de microplásticos y su posterior detección ya se ha utilizado en el desarrollo de distintos procedimientos. A modo de ejemplo, Gagné et. al.¹⁷ propuso una metodología basada en fluorescencia para la detección de nanopartículas de PS en tejidos biológicos, utilizando las propiedades solvatocrómicas del RN. En el estudio, a pesar de que las nanopartículas solas aumentaron un poco la fluorescencia del RN, encontraron un cambio hipsocrómico (desplazamiento de la banda espectral a menores longitudes de onda) característico en los espectros de emisión cuando el RN y los nanoplásticos se incubaron con una fracción de tejido celular. Para explicarlo, prepararon suspensiones

de RN y nanoplásticos (50 y 100nm) en presencia de concentraciones crecientes de dos tensoactivos (Tween-20 y TX-100) en lugar de los fosfolípidos presentes en las muestras celulares. Los datos revelaron que ambos tensoactivos aumentan fácilmente los valores de fluorescencia cuando se agregan al RN y al nanoplástico. Como resultado, la intensidad de fluorescencia fue proporcional a la concentración de los nanoplásticos y la adición de NP en extractos de tejido desplazó en mayor medida hacia el azul los espectros de emisión (a 623 nm desde el pico de rojo del Nilo normal a 660 nm).

2. OBJETIVOS Y PLANTEAMIENTO DEL TRABAJO

El objetivo general del presente Trabajo de Fin de Grado se centra en el desarrollo de un procedimiento analítico que permita la detección de micro- y nanopartículas de poliestireno en una matriz acuosa mediante su extracción en punto de nube y posterior cuantificación basada en su interacción con un reactivo fluorescente. Para ello, se establecen los siguientes objetivos concretos:

En primer lugar, se estudiarán las condiciones óptimas para llevar a cabo la extracción en punto de nube (CPE) trabajando con micro- y nanopartículas de PS etiquetadas con un fluoróforo.

En segundo lugar, se estudiará la interacción de micro- y nanopartículas de PS con el reactivo fluorescente Rojo Nilo, así como las condiciones en las que se puede llevar a cabo su cuantificación mediante fluorescencia molecular. Finalmente se evaluarán las prestaciones analíticas del método desarrollado.

Adicionalmente se plantean otros objetivos relacionados con mi formación, tales como: adquirir mayor autonomía en el laboratorio, búsqueda y gestión bibliográfica, conocer las particularidades de trabajar con nanomateriales, ampliar los conocimientos en algunas técnicas de separación y de detección, o la propia resolución de problemas que surgen durante el desarrollo de los ensayos, así como la gestión y el tratamiento de datos.

3. PARTE EXPERIMENTAL

3.1. Instrumentación

- Espectrómetro de Fluorescencia modelo *LS45 (Perkin Elmer)*, equipado con lámpara de emisión de Xe (continuo), software informático *FLWinLab*
- Balanza analítica modelo *AG245 (Mettler Toledo)*
- Balanza analítica modelo *GH-200 (A&D Weighing)*

3.2. Material de laboratorio

- Micropipetas
 - 10-100 μ L (*Hirschmann Laborgerate*)
 - 20-200 μ L (*EASY 40 Elite*)
 - 100-1000 μ L y 0,5-5mL (*Kartell*)
- Baño de ultrasonidos (*Selecta*)
- Estufa (*Memmert*)
- Centrífuga (*Thermo Scientific Multifuge X1R*)
- Tubos de vidrio, 10mL, para centrífuga con tape (*PYREX England*)
- Cubeta de cuarzo de precisión (*Hellma Analytics*) para las medidas de fluorescencia.

3.3. Reactivos

3.3.1. Estándares de poliestireno

A lo largo del trabajo se han utilizado suspensiones de poliestireno marcado con fluoróforo (PS(Flu)) de 0,5 y 2 μ m de diámetro (*Sigma-Aldrich*), de concentración 2,5% (m/v) y una concentración de fluoróforo de 0,31% (m/m), así como suspensiones de poliestireno sin marcar (PS) de 0,5 y 2 μ m de diámetro (*Sigma Aldrich*), de concentraciones 2 y 10% (m/v) respectivamente.

Para el estudio de la selectividad del método desarrollado, se empleó una suspensión de 10 g/L de nanopartículas de SiO₂ de 0,5 μ m de diámetro (*Sigma Aldrich*).

3.3.2. Extracción en punto de nube

Para llevar a cabo la extracción en este trabajo se han utilizado distintos tensoactivos: Tritón X-67 (TX-67) (*Sigma Aldrich*), Tritón X-100 (TX-100) (*Sigma Aldrich*) y Tritón X-114 (TX-114) (*Sigma Aldrich*). Las distintas disoluciones se prepararon pesando la cantidad necesaria de tensoactivo y diluyendo en un volumen conocido de disolvente (agua ultrapura, obtenida mediante sistema *Milli-Q Advantage*, (*Molsheim*)). Además, se ha utilizado sulfato de magnesio (*Scharlau*, 99-100,5% de pureza).

3.3.3. Reactivo fluorescente

Para la detección de los microplásticos tras la extracción se ha utilizado el reactivo fluorescente Rojo Nilo (*Sigma Aldrich*).

3.4. Preparación de disoluciones

Todas las disoluciones se prepararon por pesada en balanza analítica. Se prepararon disoluciones intermedias (tabla 1) a partir de los reactivos, diluyendo con agua ultrapura, excepto el Rojo Nilo que se disolvió en acetona (*Sigma Aldrich*, $\geq 99,9\%$ de pureza). Las disoluciones para los ensayos fueron preparadas a partir de estas disoluciones intermedias, siempre diluyendo en agua ultrapura.

Disoluciones Intermedias	Concentración
PS(Flu) 0,5 μm	[PS] = 100 mg/L; [Flu] = 0,3 mg/L
PS(Flu) 2,0 μm	[PS] = 100 mg/L; [Flu] = 0,3 mg/L
PS 0,5 μm	[PS] = 100 mg/L
PS 2,0 μm	[PS] = 100 mg/L
TX-67	10% m/v
TX-100	10% m/v
TX-114	10% m/v
MgSO ₄	1,0 M
Rojo Nilo	1 g/L
SiO ₂ 0,5 μm	[SiO ₂] = 100 mg/L

Tabla 1. Concentración de las disoluciones intermedias

3.5. Procedimientos

3.5.1. Extracción en punto de nube (CPE)

Todas las extracciones en punto de nube se llevaron a cabo en viales de vidrio de 10 mL, con el fin de evitar una posible contaminación de plásticos migrados desde los recipientes, y agua ultrapura como disolvente.

Para poder llevar a cabo la extracción es necesario que la disolución incluya un tensoactivo y una sal de magnesio (la fuerza iónica facilita la separación de fases¹⁴). Al realizar la optimización de la CPE se decidió que el vial debía contener TX-114 0,10% (m/v) y MgSO₄ 1,0M. Según el ensayo realizado, se añadió la concentración de PS(Flu) estudiada o, en su lugar, PS y RN. Tras haber añadido los reactivos, todas las disoluciones para CPE se llevaron a un volumen final de 10 mL.

Las disoluciones se calentaron en estufa a 40°C durante 30 minutos. Después se centrifugaron a 2000 rpm, a temperatura ambiente (20°C) durante 5 minutos. Finalmente, se dejaron reposar 2 minutos, se retiró el sobrenadante, el extracto se llevó a un volumen final de 10 mL con agua ultrapura y se agitó manualmente durante un minuto. En el caso de los ensayos llevados a cabo con RN, la suspensión resultante se tapó con papel de aluminio para protegerla de la luz ambiental, salvo que se indique lo contrario, hasta su medida mediante fluorescencia. En estos ensayos se midió el tiempo transcurrido entre la preparación de las suspensiones y la medida.

3.5.2. Análisis mediante fluorescencia molecular

Todas las medidas se realizaron en cubeta de cuarzo de precisión de 10,00 mm. Las condiciones de medida fueron variando con el transcurso del trabajo. Los ensayos correspondientes a las medidas de los PS(Flu) se realizaron fijando la ganancia del detector al máximo valor permitido (voltaje de 900 V), debido a la baja concentración de fluoróforo en los poliestirenos (PS(Flu)) utilizados. En el caso de los ensayos con el reactivo RN, se trabajó a un valor constante de 775 V. En general, se registraron los barridos de emisión en todos los ensayos para estudiar tanto los efectos sobre la intensidad fluorescente como la posible modificación de los espectros.

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1. Obtención del espectro de excitación y emisión del PS fluorescente

Con el objetivo de poder evaluar el rendimiento de extracción mediante CPE, se estudió la fluorescencia de los PS(Flu), de forma que se pudiera cuantificar su contenido en el medio extractante. Para comenzar este estudio se trabajó con PS(Flu), preparando disoluciones de concentración conocida y midiendo directamente su fluorescencia. Empleando partículas de PS(Flu) de 0,5 y 2,0 μm se obtuvieron los espectros de la figura 1.

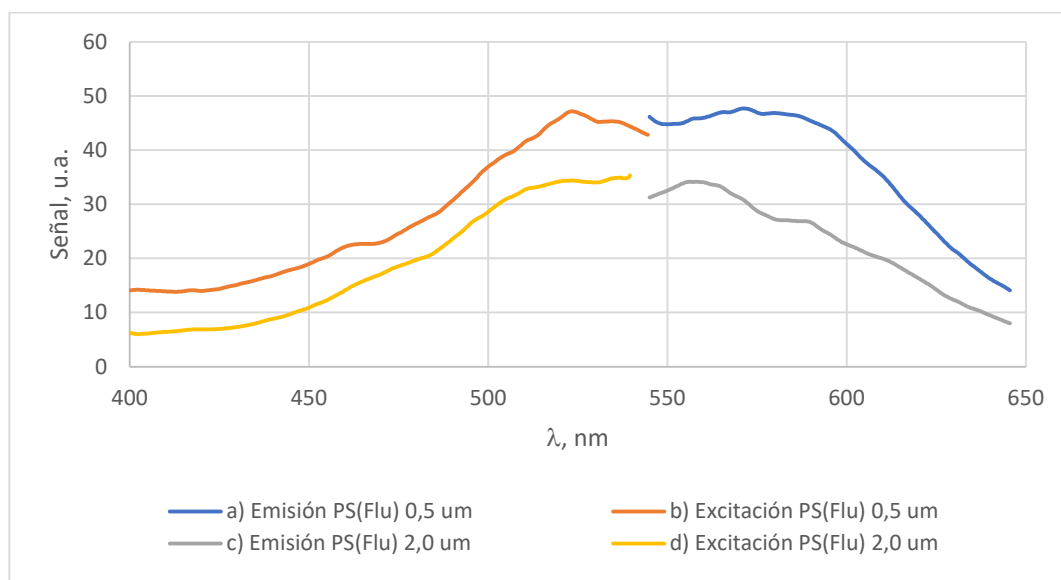


Figura 1 – Espectros de fluorescencia (900V). Barridos de excitación (400-545 nm; $\lambda_{em} = (b) 571 \text{ nm}$ (d) 558 nm) y barridos de emisión (545-640 nm; $\lambda_{exc} = 523 \text{ nm}$). Concentración de PS (Flu) 10 mg/L. Tamaño de partícula PS (a, b) 0,5 μm y (b, c) 2,0 μm .

Los máximos de excitación y de emisión obtenidos fueron de 524 nm y 571 nm respectivamente. Las señales de fluorescencia son más intensas para las partículas de PS 0,5 μm , probablemente debido a su mayor relación superficie:volumen, que hace que para una misma concentración en masa haya un mayor número de fluoróforos capaces de emitir radiación.

4.1.1. Optimizaciones con PS fluorescente

Debido al carácter fluorescente que presentan algunos de los tensoactivos comúnmente empleados en la extracción en punto de nube, se estudió su posible influencia en la señal de PS(Flu) observada anteriormente para ambos tamaños. Los medios estudiados fueron: agua ultrapura, TX-67, TX-100 y TX-114. Los espectros de emisión se muestran en la figura 2. Para su obtención, se fijó como longitud de onda en el monocromador de excitación el máximo obtenido para el PS(Flu) en agua. En las disoluciones del estudio la concentración de fluoróforo (correspondiente a 10mg/L de PS(Flu)) era del 0,03% (m/v), mientras que los tensoactivos se encontraban al 0,30% (m/v). Mientras que el TX-67 no presenta ninguna influencia, tanto el TX-100 como el TX-114 tienen propiedades fluorescentes, lo que provoca la aparición de un pico más intenso que el del fluoróforo del PS (debido a la elevada concentración en el medio), con un máximo a 597 nm en el caso del TX-100 y 598 nm en el de TX-114, y que se superpone parcialmente al máximo del PS(Flu) ($\lambda_{em} = 571 \text{ nm}$), lo que dificultaría su posterior cuantificación.

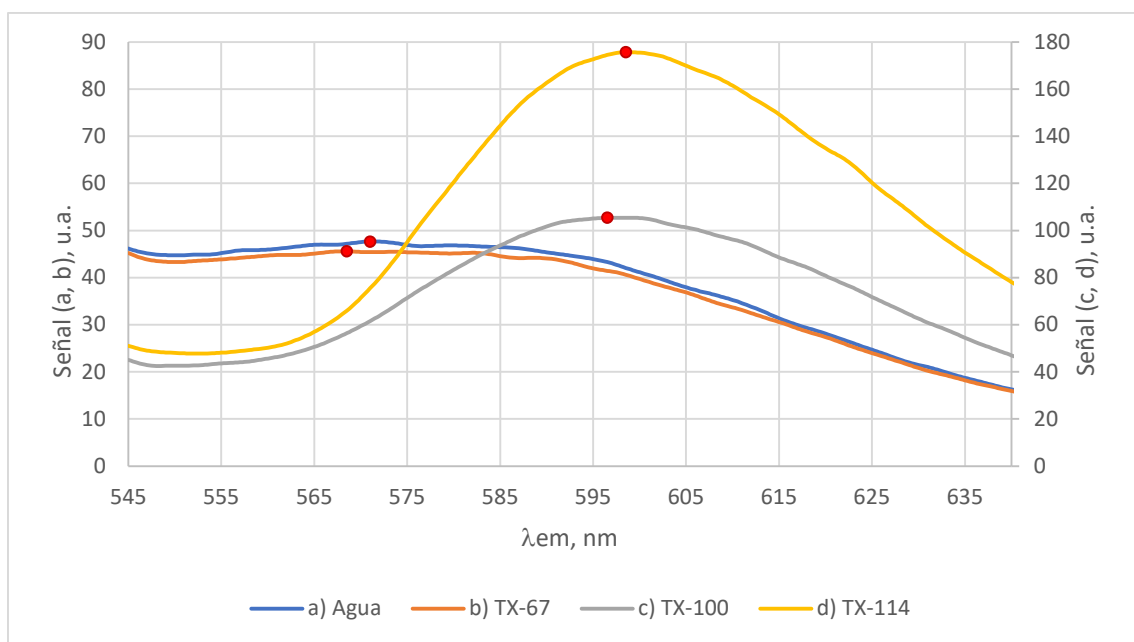


Figura 2 – Espectros de fluorescencia (900V). Barridos de emisión (545-640 nm; $\lambda_{exc} = 524$ nm). Suspensiones de PS(Flu) 0,5 μ m (10 mg/L) y TX en (b), (c) y (d): 0,3% (m/v). Longitudes de emisión de los máximos en nm: (a) 571, (b) 569, (c) 597 y (d) 598

En la figura 3 se muestra el espectro de emisión del tensioactivo TX-114 junto con los espectros en presencia de PS sin marcar y del PS(Flu). Se comprueba que la presencia de micropartículas como las de PS no modifican la emisión fluorescente del tensioactivo, y que, para longitudes de onda inferiores, aproximadamente a 570 nm, la fluorescencia observada se debe únicamente a la presencia del fluoróforo en los PS(Flu).

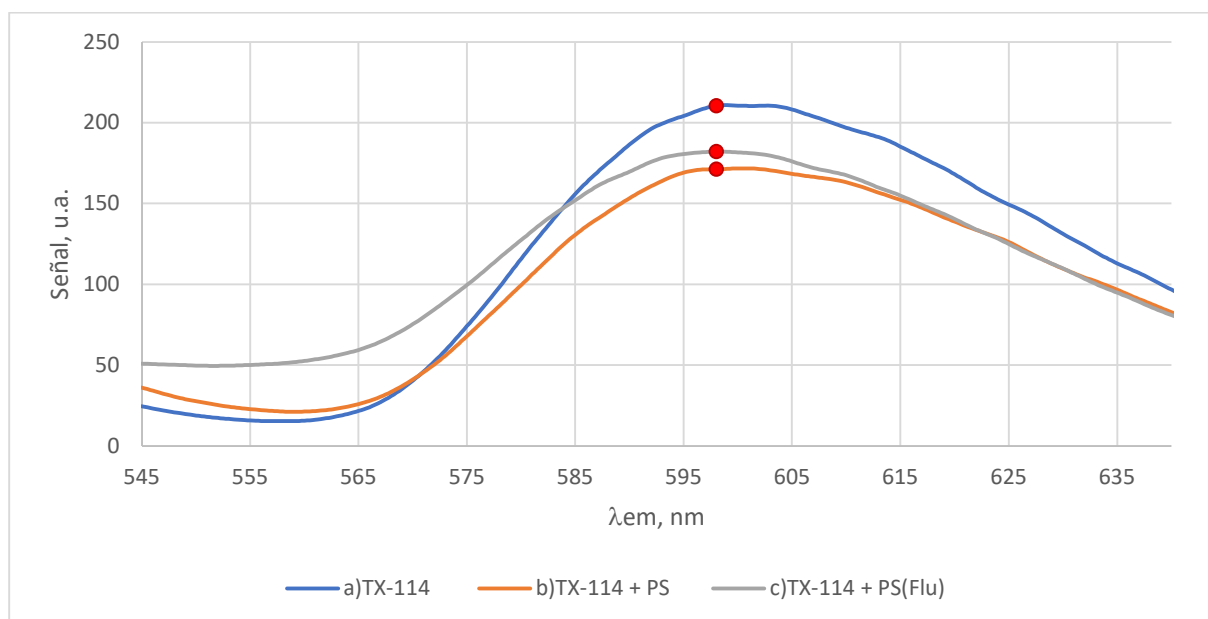


Figura 3 – Espectros de fluorescencia (900V). Barridos de emisión (545-640 nm; $\lambda_{exc} = 524$ nm). Concentración de TX 0,03% (m/v). Suspensiones de PS en (b) y PS(Flu) en (c); ambas de 0,5 μ m y 10 mg/L. Longitud de emisión de los máximos: 598 nm

En estas condiciones, se estudió si era posible la determinación del PS(Flu) en un medio con un tensoactivo que emite radiación en una zona del espectro próxima. Para ello, se realizó un ensayo en el que se aumentó la concentración de TX-114 en el medio (de 0,03% a 0,5%) midiéndose la intensidad fluorescente a 571 nm (máximo del PS(Flu)) y a 598 nm (máximo del TX-114). Analizando los datos se observó que las señales a 598 nm aumentaban hasta alcanzar un máximo a 0,1%, probablemente por fenómenos de autoabsorción a mayores concentraciones, mientras que la señal a 571 nm disminuía en todo el intervalo de concentraciones (ver anexo A1). En estas condiciones, se realizó la determinación de PS(Flu) 0,5 μm en presencia de TX-114, mediante recta de calibrado, teniendo en cuenta la señal del tensoactivo en ausencia de PS(Flu) (ensayo en blanco). Las disoluciones se prepararon con concentración variable de PS (Flu) 0,5 μm en presencia de TX-114 al 0,03% (mayor señal debida al tensoactivo a 571 nm). Los resultados se muestran en la figura 4.

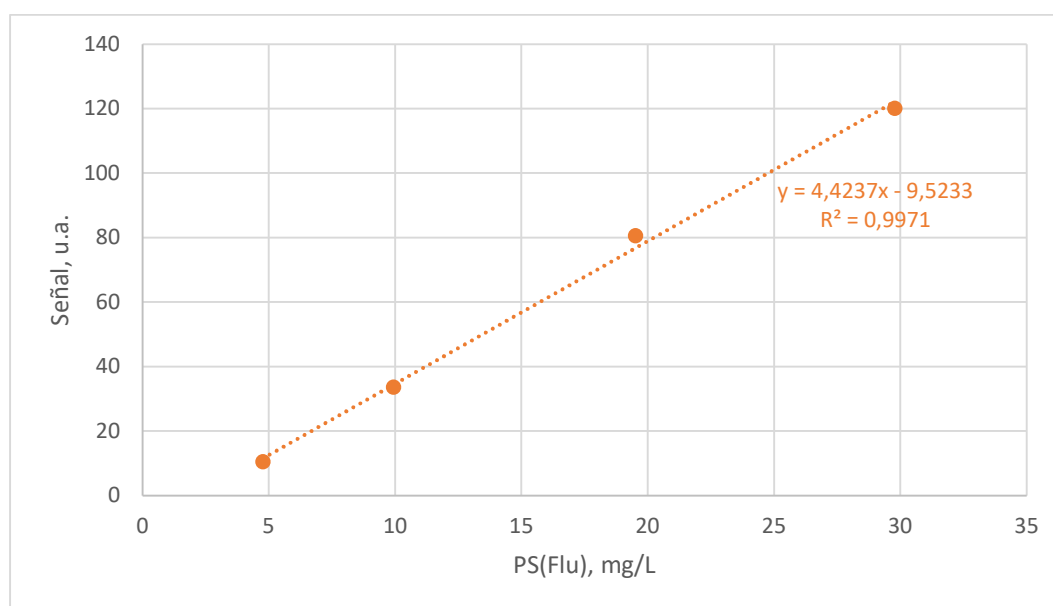


Figura 4 – Recta de calibrado de PS(Flu) en presencia de TX-114 (0,03%). Obtenida de los espectros de emisión (voltaje 900V), $\lambda_{exc} = 524 \text{ nm}$ y $\lambda_{em} = 571 \text{ nm}$; y corregida con la señal de blanco.

4.2. Extracción en punto de nube (CPE). Optimización de las condiciones de extracción

En un primer ensayo, y como punto de partida, se siguió el procedimiento descrito en la bibliografía¹⁴, en el que se realiza la extracción de micro- y nanoplásticos (principalmente <5 μm) en aguas ambientales, tal y como se ha detallado en la introducción (1.3). Para ello, se preparó la disolución en un vial ($V_f = 10 \text{ mL}$), se introdujo en la estufa durante 15 minutos a 75°C y finalmente se centrifugó a 3000 rpm durante 10 minutos a 4°C. La disolución del vial contenía TX-114 al 0,03% (m/v), PS(Flu) 20 mg/L y MgSO_4 0,1 M.

En estas condiciones, no se obtuvieron extractos, por lo que, en un segundo ensayo se siguió el mismo procedimiento, pero con tres tensoactivos diferentes (TX-67, TX-100 y TX-114), variando su concentración (0,03% y 0,2 % m/v) e introduciendo los viales en el congelador a -20°C durante 5 minutos tras la centrifugación, sin observarse mejoras. Se decidió entonces adaptar un procedimiento que había funcionado anteriormente, pero aplicado a la extracción de nanopartículas de plata, con el que se tenía experiencia previa¹⁸ y que se detalla en el apartado 3.5.1. Este procedimiento resultó ser eficaz, obteniéndose un extracto de color rosáceo debida a la presencia del PS(Flu)).

4.2.1. Rendimiento de extracción mediante medida de fluorescencia del PS fluorescente

Para estudiar el rendimiento de la extracción se preparó una suspensión de PS(Flu) de 5 mg/L que fue sometida al procedimiento de extracción, realizándose el ensayo por triplicado. Esta suspensión inicial se midió también por fluorescencia para poder calcular el rendimiento de acuerdo con la expresión (1). Además, se preparó una disolución con TX-114 de la misma concentración (0,1%) en ausencia de PS(Flu) que también fue sometido a la extracción CPE.

$$\text{Rendimiento CPE} = \frac{\text{Señal del extracto}}{\text{Señal suspensión inicial}} \cdot 100 \quad (1)$$

Las señales obtenidas a la longitud de onda de emisión del fluoróforo se muestran en las tablas 2 y 3, obteniéndose un rendimiento de extracción del $104 \pm 8\%$.

Disolución	CPE 01	CPE 02	CPE 03	media	s
Señal (u.a.)	48,47	46,49	54,51	50	4

Tabla 2. Intensidad de fluorescencia (u.a.) de los extractos. $\lambda_{exc} = 524 \text{ nm}$ y $\lambda_{em} = 571 \text{ nm}$

Disolución	Sin CPE	Blanco TX-114
Señal (u.a.)	47,71	29,31

Tabla 3. Intensidad de fluorescencia de la suspensión de referencia y del tensoactivo TX-114. $\lambda_{exc} = 524 \text{ nm}$ y $\lambda_{em} = 571 \text{ nm}$

4.3. Estudios previos con Rojo Nilo

4.3.1. Optimización de las condiciones para la extracción y medida de PS con Rojo Nilo

Tras comprobar que las condiciones utilizadas para la extracción en punto de nube eran adecuadas para extraer de forma cuantitativa los PS presentes en una suspensión acuosa, se procedió al estudio del efecto de los PS sobre la fluorescencia del Rojo Nilo, que permitiera la detección de microplásticos en el extracto, de acuerdo con las variaciones del entorno que sufre el fluoróforo ya vistas en el apartado 1.4. de la introducción.

El estudio de la fluorescencia de disoluciones de RN (8 mg/L) en medio TX-114, correspondiente a las condiciones en las que se encuentra el extracto, reflejó unos máximos de excitación a 555 nm y de emisión a 628 nm.

A continuación, se estudió si la presencia de concentraciones crecientes de PS 0,5 μm en el medio de TX-114 modificaba la fluorescencia del RN. Los resultados se presentan en la figura 5.

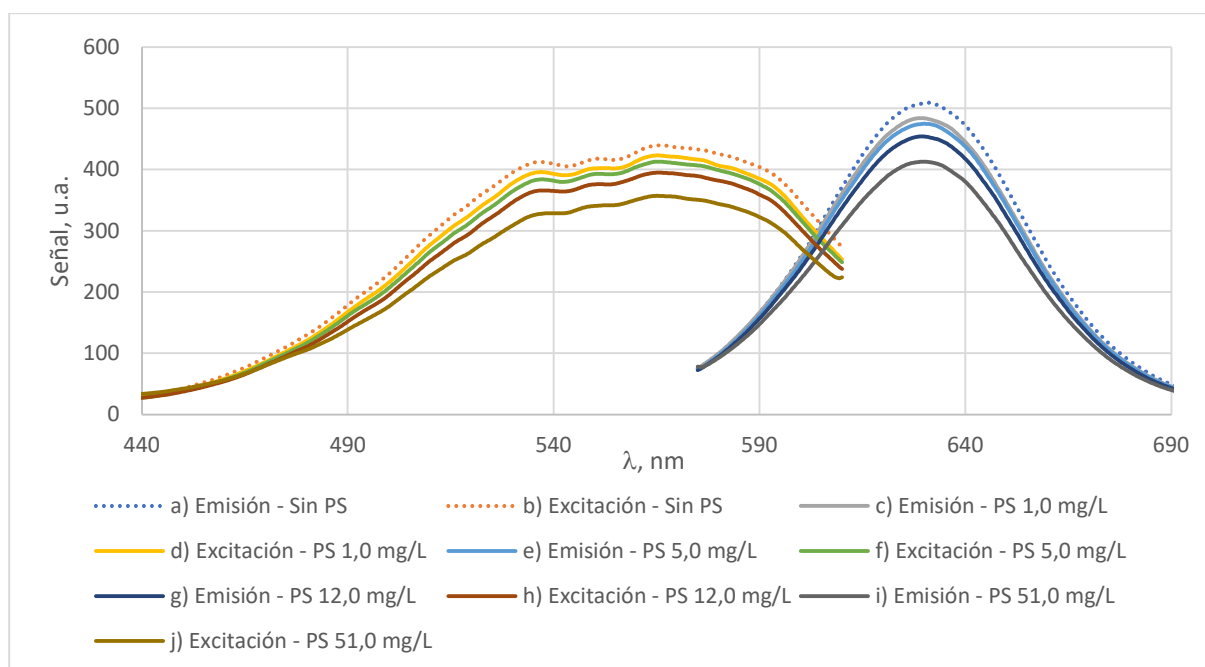


Figura 5 – Espectros de fluorescencia (775V). Barridos de excitación (440-610 nm; $\lambda_{em} = 571$ nm) y barridos de emisión (575-690 nm; $\lambda_{exc} = 524$ nm). Suspensiones de PS $0,5\mu m$, en presencia de RN (1,80 mg/L) y TX-114 (0,1%). (a) y (b) no contienen partículas de PS. Ninguna suspensión fue sometida a CPE.

Como puede observarse, la señal de fluorescencia del RN disminuye conforme aumenta la concentración de PS, sin apreciarse una variación en los máximos, ni en la forma de los picos. Estos resultados no se corresponden con el comportamiento esperado y descrito en la bibliografía¹⁷, en el que se describe un desplazamiento hacia menores longitudes de onda conforme la polaridad del entorno disminuye. En este artículo se sugiere que las micropartículas de poliestireno generan un entorno más hidrofóbico que el tensoactivo del medio, lo que provoca un desplazamiento sobre el espectro de emisión del RN.

A pesar de estos resultados contradictorios, se observó que la disminución de la señal del RN era proporcional a la concentración de PS. Se decidió entonces estudiar si esta disminución se podía utilizar como método para la cuantificación de PS extraídos mediante CPE, estudiando las condiciones óptimas y las prestaciones analíticas del método.

4.4. Determinación de la concentración de PS mediante CPE y medida de fluorescencia con Rojo Nilo

En una primera aproximación, se estudió si las medidas de los blancos y de las suspensiones de PS tras someterlas a CPE diferían significativamente.

Para el estudio de la repetitividad del blanco se prepararon tres disoluciones en ausencia de PS que fueron sometidas a CPE y de las que se tomaron medidas de fluorescencia. Las concentraciones de las disoluciones y las señales obtenidas se encuentran en la tabla 4.

Disolución	B1	B2	B3	media	s
Señal (u.a.)	365,22	368,24	376,09	367	6
[RN], mg/L	1,43	1,40	1,62		
[TX-114], % (m/v)	0,10	0,10	0,11		

Tabla 4. Concentraciones y señal de disoluciones del estudio de repetitividad del blanco. Suspensiones de RN (1,5 mg/L) y TX-114 (0,1%). Condiciones de medida: 775 V, $\lambda_{exc} = 555$ nm y $\lambda_{em} = 628$ nm

En una disolución de RN 1,5 mg/L se obtiene una señal media de 370 ± 6 u.a. Esto se traduce en una desviación estándar relativa del 1,5%.

Se repitió el mismo ensayo con cuatro suspensiones que contenían la misma concentración de PS, de RN y de TX-114. Las concentraciones de las disoluciones y las señales obtenidas se encuentran en la tabla 5.

Disolución	M1	M2	M3	M4	media	s
Señal (u.a.)	345,44	341,43	348,50	324,33	340	11

Tabla 5. Concentraciones y señal de disoluciones del estudio de repetitividad de muestras. Suspensiones de PS 0,5 μ m (10 mg/L), RN (1,6 mg/L) y TX-114 (0,1%). Condiciones de medida: 775 V, $\lambda_{exc} = 555$ nm y $\lambda_{em} = 628$ nm

En este caso, la desviación estándar relativa de la señal es del 3,2%, aproximadamente el doble que la de los blancos.

Se intentó mejorar la repetitividad de la muestra añadiendo el RN tras la extracción, pero sin éxito, al obtenerse una desviación estándar relativa del 11%.

Con el fin de saber si las señales del ensayo en blanco y las de las suspensiones con PS 10mg/L, son significativamente diferentes se realizó un test t de las señales de ambos grupos. Previamente, un análisis de varianza de un factor (anexo B1) confirmó que las medias muestrales diferían significativamente ($F_{experimental} = 18,62$; $F_{crítica} = 6,61$).

A partir del test t (anexo B2), suponiendo varianzas desiguales, se obtuvo un valor t (una cola 2,01) inferior al estadístico t (4,76). Así se confirmó que las señales de una suspensión de PS 10 mg/L son significativamente inferiores a las de blanco, con un nivel de confianza del 95%.

4.4.1. Determinación de PS mediante la variación de la intensidad fluorescente del RN.

Tras comprobar que la reproducibilidad de la extracción permitía determinar la presencia de PS mediante la modificación de la señal generada por el RN, se realizó una recta de calibrado a partir de disoluciones de concentración de PS creciente, todas ellas 1,8 mg/L en RN y TX-114 0,1% m/v (sin proceso de extracción previo). Los resultados se muestran en la figura 6. Se observa que el comportamiento (línea azul) se aleja algo de la linealidad, así como el punto que no contiene PS (en gris). Puesto que la señal depende de la concentración de RN, se representó la recta con las señales normalizadas respecto a la concentración de RN (línea naranja), pero no se mejoraron los resultados.

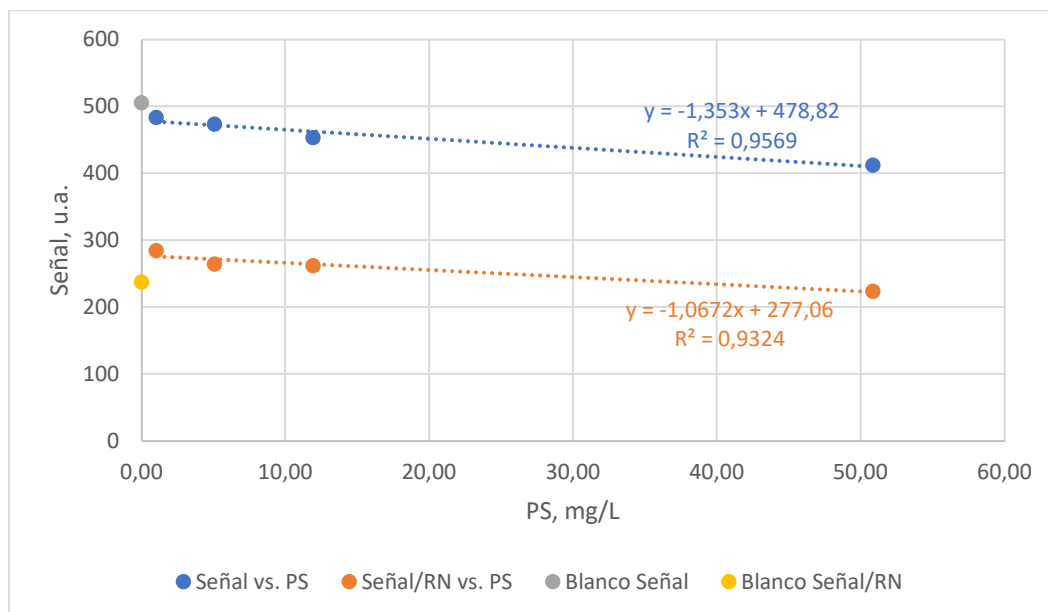


Figura 6 – Recta de calibrado de PS en presencia de RN (1,8 mg/L) y TX-114 (0,11%). Obtenida de los espectros de emisión (voltaje 775V), $\lambda_{exc} = 555 \text{ nm}$ y $\lambda_{em} = 628 \text{ nm}$. Ninguna de las suspensiones se sometió a CPE.

Como alternativa, se realizó una recta de calibrado, añadiendo PS directamente sobre la cubeta de medida, la cual contenía inicialmente una disolución de blanco (RN 1,35 mg/L y TX-114 0,1% m/v) sin PS, de forma que la concentración de RN no se viera alterada y reducir de esta forma su efecto sobre la señal. Los resultados se muestran en la figura 7.

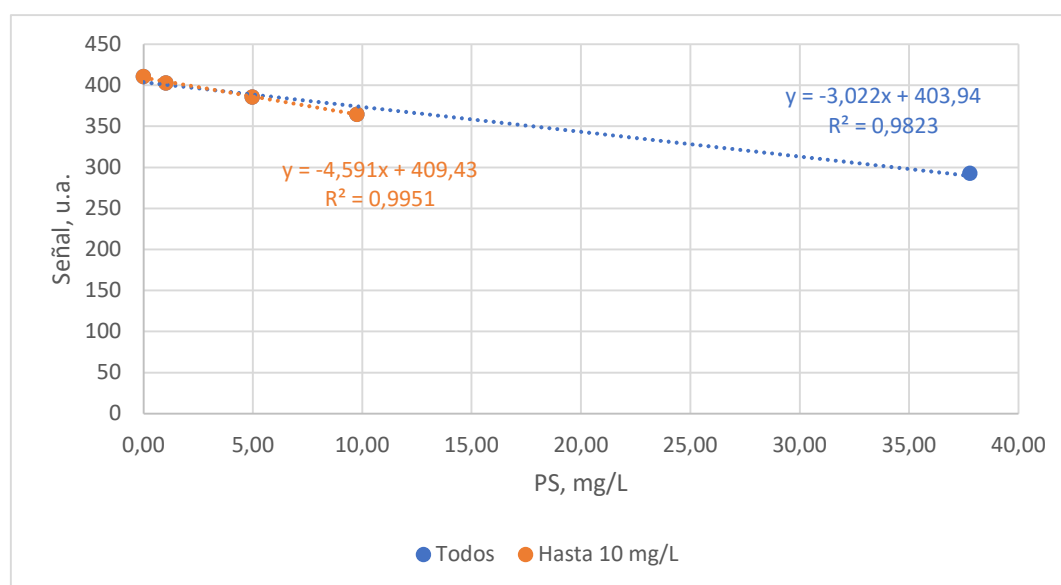


Figura 7 – Recta de calibrado de PS adicionado sobre una disolución de RN (1,35 mg/L) y TX-114 (0,11%). Obtenida de los espectros de emisión (voltaje 775V), $\lambda_{exc} = 555 \text{ nm}$ y $\lambda_{em} = 628 \text{ nm}$. Ninguna de las suspensiones se sometió a CPE.

Estos resultados mejoraron los obtenidos anteriormente, al mejorar los coeficientes de regresión, por lo que se decidió emplear una estrategia basada en adición estándar, de forma que se mantuviera constante la concentración del RN en todas las disoluciones medidas. Aunque se pierde algo de linealidad para concentraciones mayores a los 10 mg/L de PS, en posteriores ensayos se trabajó con concentraciones de hasta 35 mg/L (ver apartado 4.4.3.2). El límite de detección, considerando tres

veces la desviación estándar del blanco (a partir de tres extracciones independientes correspondientes a los datos de la tabla 3), fue de 3,9 mg/L.

4.4.2. Determinación de PS mediante adición estándar.

Para este ensayo se realizó la medida de una disolución de RN 1,7 mg/L en TX-114 0,1% como blanco. Esta señal se utiliza como referencia para la extrapolación de la recta por adición estándar, al tener pendiente negativa. Como muestra se tomó una suspensión de 5 mg/L de PS, y tras someterla a extracción CPE se realizaron sobre el extracto cuatro adiciones de concentración conocida y creciente de PS, obteniéndose los resultados que se muestran en la tabla 6.

$\lambda_{exc} = 555 \text{ nm}$	[PS]	Señal
$\lambda_{em} = 628 \text{ nm}$	mg/L	u.a.
Blanco	-	299,1
Muestra 01	5,00	287,79
Adición 01	10,01	271,13
Adición 02	15,01	254,87
Adición 03	20,00	238,58
Adición 04	24,99	227,78

Tabla 6 – Concentraciones y señales obtenidas en el ensayo de adición estándar. Condiciones de medida: 775V

La extrapolación de la recta sobre la señal de referencia (figura 8), dio como resultado una concentración de $4,10 \pm 0,95 \text{ mg/L}$, lo que supone una recuperación del $82 \pm 23\%$.

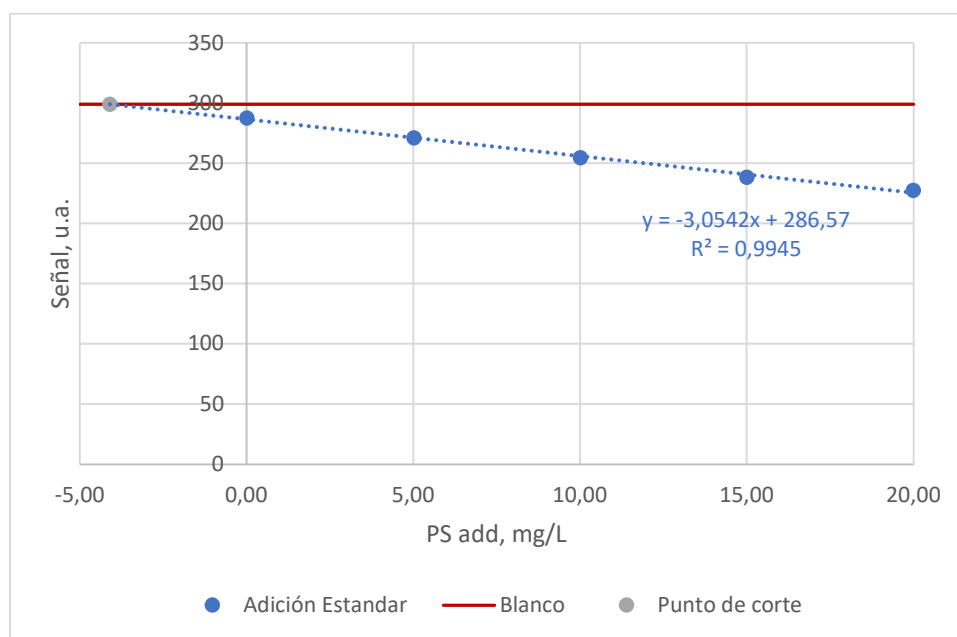


Figura 8 – Adición estándar sobre suspensión (PS 5,0 mg/L). Blanco: media de dos suspensiones (RN 1,72mg/L). Punto de corte entre la señal de blanco y la recta extrapolada (-4,1; 299,1). Condiciones de medida: 775 V, $\lambda_{exc} = 555 \text{ nm}$ y $\lambda_{em} = 628 \text{ nm}$

Uno de los problemas que se observó con esta metodología fue la elevada incertidumbre, debida fundamentalmente a la irreproducibilidad en la preparación de la disolución del blanco, y a la propia inestabilidad del RN en el medio con el tensoactivo TX-114 tras la extracción CPE, que provoca una disminución de la señal frente al tiempo. El estudio de la variabilidad que provoca el tiempo en la señal de fluorescencia del RN se presenta en el apartado siguiente.

4.4.3. Prestaciones analíticas del procedimiento desarrollado

4.4.3.1. Estudio de las variables que afectan a la precisión.

En el transcurso de este trabajo se han ido observando distintas variables que afectan a la precisión del método. Entre ellas se encuentran: la emisión de fluorescencia del tensoactivo TX-114, la variabilidad de concentración de RN en las disoluciones preparadas y la variabilidad de la señal en función del tiempo.

En el caso de la emisión fluorescente del tensoactivo TX-114, vista en el apartado 4.1.1., se observó que su preparación era muy reproducible y su señal permanecía estable frente al tiempo para una concentración dada, por lo que no se consideró su influencia.

Sin embargo, la concentración de RN fue más difícil de reproducir en las disoluciones preparadas. Así, se realizó un estudio con tres disoluciones de distinta concentración de RN, obteniendo como resultado que la variación de la señal no es lineal, tal y como se muestra en la figura 9. Esto explicaría los malos resultados obtenidos al representar los datos normalizados, al no ser la señal proporcional a la concentración de RN.

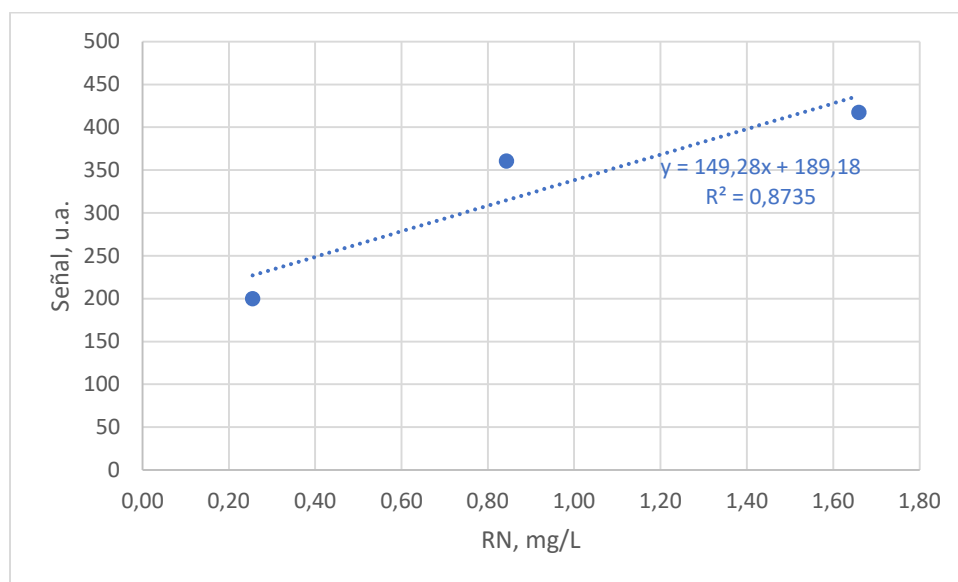


Figura 9 – Señal frente a concentración de RN y ajuste mediante regresión lineal. Condiciones de medida: 775 V, $\lambda_{exc} = 555 \text{ nm}$ y $\lambda_{em} = 628 \text{ nm}$

Para el estudio del efecto del tiempo sobre la emisión de fluorescencia del RN se realizaron varios ensayos. En primer lugar, se prepararon cuatro blancos con RN (1,6mg/L) y TX-114 (0,1%). Estos fueron sometidos al procedimiento de extracción CPE. Dos de las disoluciones (B1 y B2) se dejaron a la luz, mientras que las otras dos (B3 y B4) se taparon con papel de aluminio para protegerlas, tratando de reducir la pérdida de fluorescencia del RN debida a posibles efectos fotocatalíticos y mejorar de esta manera la reproducibilidad de las medidas. Las rectas obtenidas de señal frente a tiempo se muestran en el anexo C1, y los promedios en la figura 10.

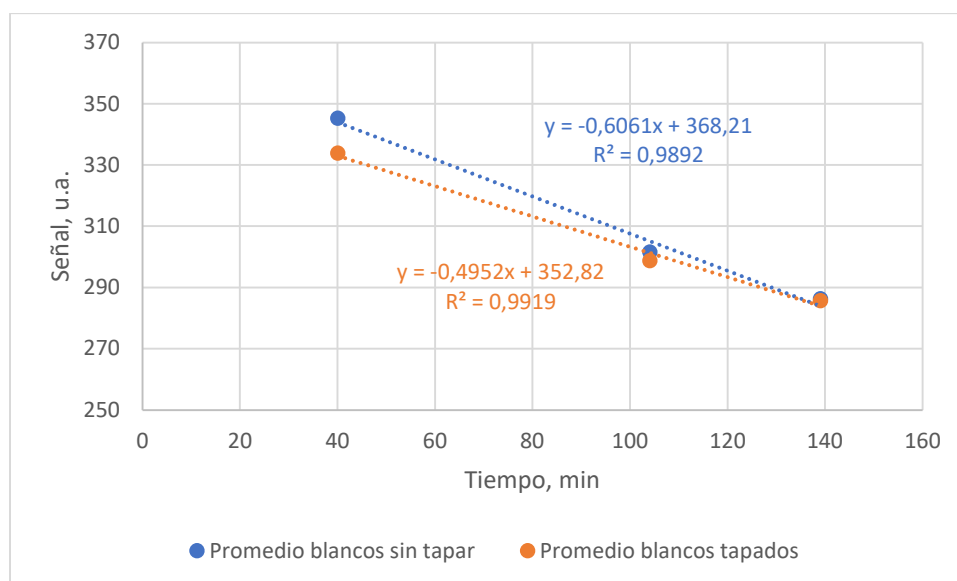


Figura 10 – Regresiones lineales de blancos frente al tiempo. Señales promedio de los blancos sometidos a luz natural (azul) y en ausencia de luz (naranja). Suspensiones de RN (1,6 mg/L) y TX-114 (0,1%). Condiciones de medida: 775 V, $\lambda_{exc} = 555 \text{ nm}$ y $\lambda_{em} = 628 \text{ nm}$

Los resultados obtenidos muestran mayor reproducibilidad de las señales y una mejor regresión lineal frente al tiempo cuando se trabaja con las disoluciones tapadas con papel de aluminio, por lo que se optó por trabajar en estas condiciones.

4.4.3.2. Evaluación de la exactitud del procedimiento optimizado.

Así, se preparó una muestra con PS 0,5 μm (5 mg/L), RN (1,5 mg/L) y TX-114 (0,1%) y se realizó una adición estándar sobre la misma, protegiendo de la luz con papel de aluminio todas las disoluciones y controlando los tiempos de medida para minimizar su efecto. Se tomaron las medidas de dos blancos (RN 1,65 mg/L y TX-114 0,1%) a los 30 minutos de resuspender el extracto obtenido en la CPE. Se realizaron un total de seis adiciones de concentración conocida y creciente de PS y los resultados obtenidos se muestran en la tabla 7.

$\lambda_{exc} = 555 \text{ nm}$	[PS]	Señal
$\lambda_{em} = 628 \text{ nm}$	mg/L	u.a.
Blanco	0	388,73
Muestra 01	4,99	371,71
Adición 01	9,93	355,74
Adición 02	14,87	337,97
Adición 03	19,81	322,66
Adición 04	24,82	308,41
Adición 05	29,82	296,27
Adición 06	34,81	286,85

Tabla 7 – Concentraciones y señales del ensayo de adición estándar en las condiciones de mayor precisión tras extracción CPE. Condiciones de medida: 775 V, $\lambda_{exc} = 555 \text{ nm}$ y $\lambda_{em} = 628 \text{ nm}$

Considerando todos los puntos, la extrapolación de la recta (sobre la señal de referencia) dio como resultado una concentración de $6,91 \pm 1,54 \text{ mg/L}$, lo que supone una recuperación del $139 \pm 22 \%$.

Si se reduce el intervalo lineal hasta los 20 mg/L de PS (figura 11), a la vista de lo observado en el apartado 4.4.1., se obtiene como resultado una concentración de $5,44 \pm 0,54$ mg/L, lo que supone una recuperación del 109 ± 10 %.

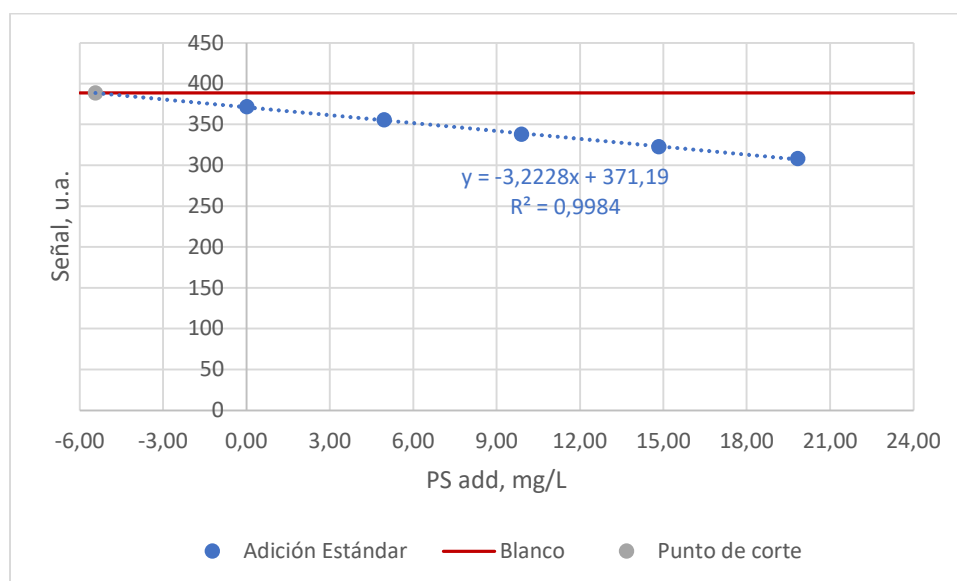


Figura 11 – Adición estándar sobre suspensión (PS 5,0 mg/L). Blanco: media de dos suspensiones (RN 1,65mg/L). Punto de corte entre la señal de blanco y la recta extrapolada (-5,4; 388,7). Condiciones de medida: 775 V, $\lambda_{exc} = 555$ nm y $\lambda_{em} = 628$ nm

Por lo tanto, los resultados obtenidos muestran una mayor exactitud y reproducibilidad cuando se realiza la primera medida de la muestra (sobre la que se realiza adición estándar) al mismo tiempo que el blanco, concretamente a los 30 minutos de resuspender el extracto de la CPE, con un rango lineal hasta los 20 mg/L.

4.4.3.3. Evaluación de la selectividad frente a otras micropartículas. Ensayo con partículas de óxido de silicio.

La selectividad del método se estudió adicionando al medio otro tipo de micropartículas de distinta naturaleza, como son las de SiO₂ del mismo tamaño que los PS estudiados (diámetro de 0,5 μ m). Para este ensayo se realizó la medida de una disolución de RN 1,6 mg/L en TX-114 0,1% como blanco (B1), de una suspensión de SiO₂ 5 mg/L, RN 1,6 mg/L en TX-114 0,1% como blanco matriz (B2) y la muestra (M1) que contiene: PS 5 mg/L y SiO₂ 5 mg/L. Sobre la muestra se realizaron adiciones de concentración conocida y creciente de PS para su cuantificación.

Los resultados obtenidos se muestran en la tabla 8.

$\lambda_{exc} = 555$ nm	[PS]	[SiO ₂]	Señal
$\lambda_{em} = 628$ nm	mg/L	mg/L	u.a.
Blanco B1	-	-	391,98
Blanco matriz B2	-	5,08	350,92
Muestra M1	5,04	5,05	334,62
Adición 01	10,01	5,05	319,34
Adición 02	14,99	5,05	305,50
Adición 03	19,96	5,05	288,17

Tabla 8 – Concentraciones y señales de adición estándar sobre muestra M1

La extrapolación de la recta sobre la señal de referencia del blanco B1 (figura 12), dio como resultado una concentración de $18,53 \pm 0,90$ mg/L, lo que supone una recuperación del 367 ± 5 %.

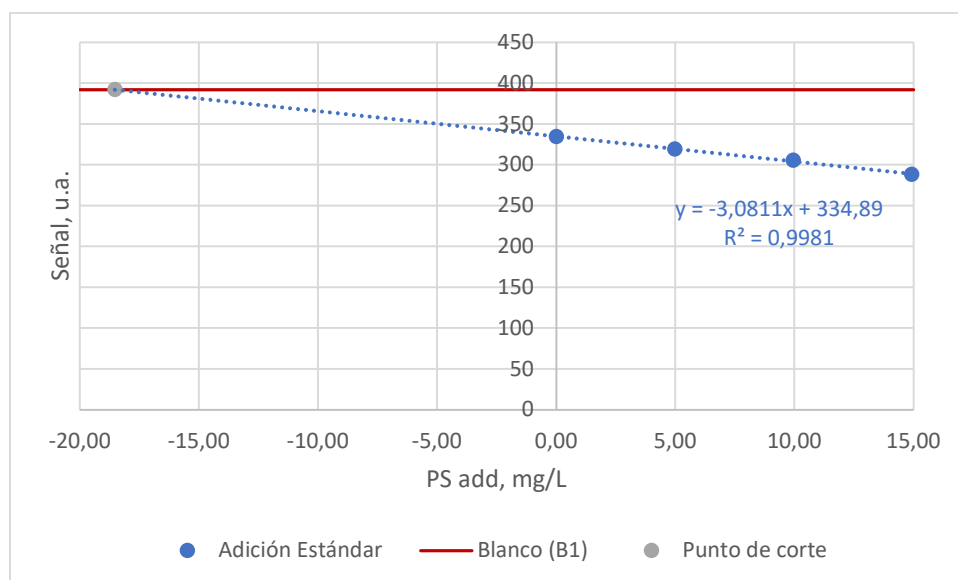


Figura 12 – Adición estándar sobre suspensión (PS 5,0 mg/L, SiO₂ 5,1 mg/L). Blanco B1 (RN 1,56 mg/L). Punto de corte entre la señal de blanco y la recta extrapolada (-18,5; 392,0). Condiciones de medida: 775 V, $\lambda_{exc} = 555$ nm y $\lambda_{em} = 628$ nm

La extrapolación de la recta sobre la señal de referencia del blanco matriz B2 (figura 13), dio como resultado una concentración de $5,21 \pm 0,55$ mg/L, lo que supone una recuperación del 103 ± 11 %.

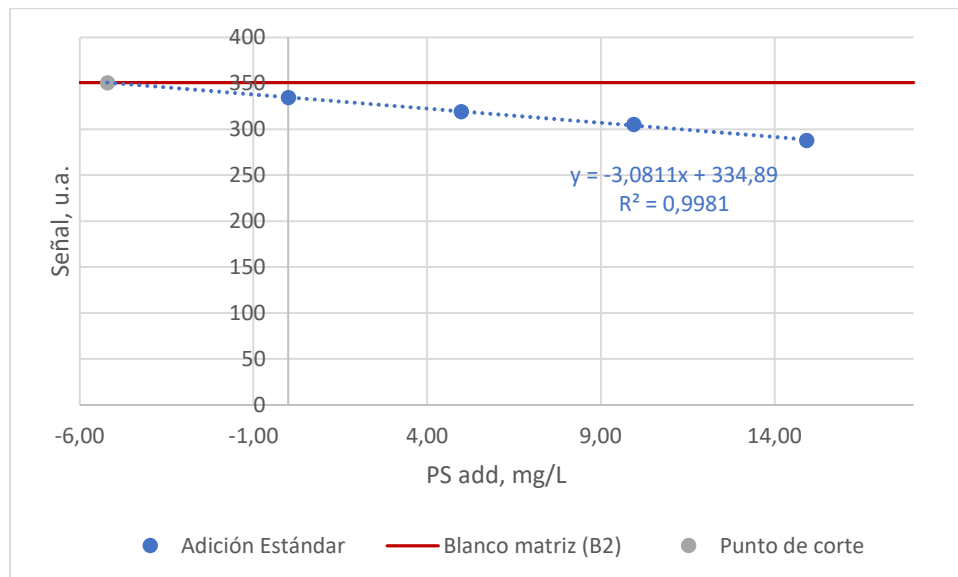


Figura 13 – Adición estándar sobre suspensión (PS 5,0 mg/L, SiO₂ 5,1 mg/L). Blanco matriz B2 (RN 1,65 mg/L). Punto de corte entre la señal de blanco y la recta extrapolada (-5,2; 350,9). Condiciones de medida: 775 V, $\lambda_{exc} = 555$ nm y $\lambda_{em} = 628$ nm

Los espectros de emisión obtenidos en este ensayo se muestran en el anexo D1. En ellos se puede observar cómo la presencia de SiO₂ desplaza el máximo de emisión a valores inferiores. Además, la presencia de SiO₂ disminuye la señal de la muestra, lo que demuestra que el procedimiento de extracción no presenta selectividad ante estas partículas SiO₂, además de indicar que la pérdida de

señal fluorescente observada, tanto para los PS como para las partículas de SiO_2 , se pueda deber a un fenómeno de dispersión de la radiación emitida por el RN, aunque serían necesario otras pruebas para confirmar este resultado. En cualquier caso, sería posible utilizar este procedimiento en presencia de otras partículas, pero requeriría de un blanco de matriz, lo que no siempre puede obtenerse (sobre todo en muestras medioambientales, alimentarias, etc).

5. CONCLUSIONES

Las conclusiones del presente Trabajo Fin de Grado pueden resumirse en los siguientes puntos:

- ❖ El análisis de micro- y nanopartículas de plástico sigue siendo un reto para la comunidad científica. Hasta la fecha, pocos son los estudios que proporcionan resultados fiables. Las limitaciones de estos procedimientos se deben principalmente al pequeño tamaño de las partículas, además de la complejidad de las muestras reales.
- ❖ El procedimiento de extracción desarrollado en este trabajo permite la separación de micro- y nanopartículas de PS de forma cuantitativa.
- ❖ La detección mediante fluorescencia molecular ha sido posible gracias a que la presencia de las partículas de PS disminuía la intensidad de señal del Rojo Nilo. La cuantificación se ha llevado a cabo mediante adición estándar. Al obtener una pendiente negativa, se utilizó la señal de blanco como referencia para la extrapolación de la recta obtenida por adición estándar. La principal desventaja de esta metodología es la elevada incertidumbre, debida principalmente a la irreproducibilidad de la preparación de las disoluciones (tanto muestras como blancos) y a la propia inestabilidad del Rojo Nilo en el medio utilizado.
- ❖ Se han estudiado las prestaciones analíticas del método, incluyendo la selectividad frente a partículas de diferente naturaleza, como óxido de silicio. Estas partículas generan importantes efectos interferentes, ya que se extraen de la misma forma que las de poliestireno estudiadas, y disminuyen también la señal del Rojo Nilo. Este efecto parece indicar que el mecanismo por el cual se produce esta disminución en la señal se debe a la dispersión provocada por las micropartículas sobre la radiación emitida por el Rojo Nilo.
- ❖ Mediante el control de las principales variables, como el tiempo hasta la medida y el efecto de la luz ambiental sobre la estabilidad del Rojo Nilo en el extracto, se ha podido determinar la concentración de una suspensión problema con una recuperación del $109 \pm 10 \%$.

Así mismo, se han completado los objetivos de formación planteados inicialmente, de forma que el desarrollo de este trabajo me ha permitido alcanzar mayor autonomía en el desarrollo de un trabajo experimental, así como resolver contratiempos en el laboratorio, además de aprender a gestionar una gran cantidad de datos e información bibliográfica.

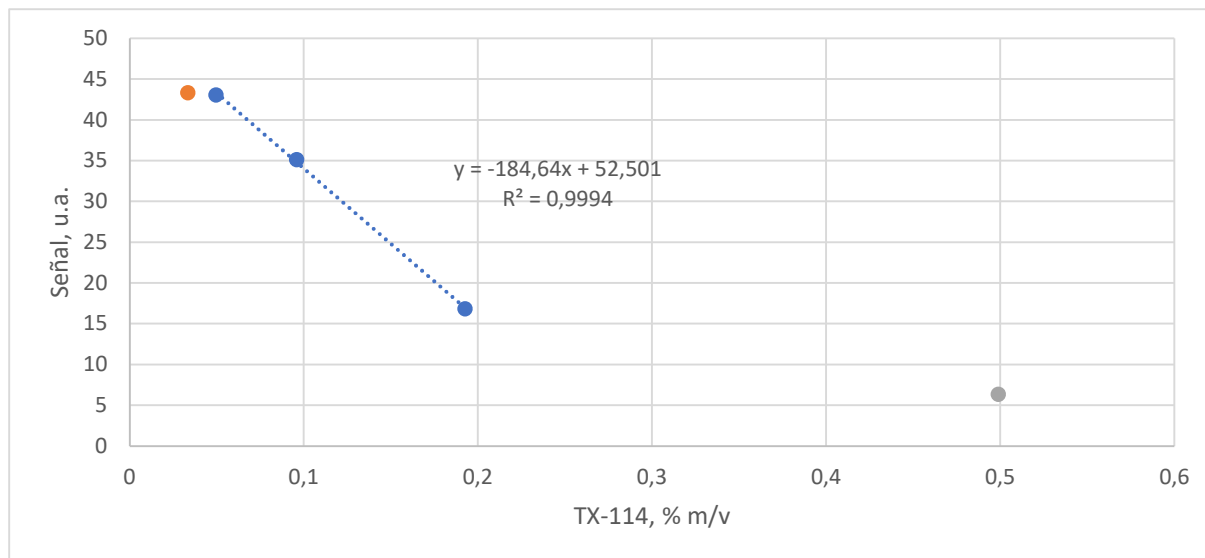
BIBLIOGRAFÍA

- (1) Lehner, R.; Weder, C.; Petri-Fink, A.; Rothen-Rutishauser, B. Emergence of Nanoplastic in the Environment and Possible Impact on Human Health. *Environmental Science and Technology*. American Chemical Society 2019. <https://doi.org/10.1021/acs.est.8b05512>.
- (2) Vitali, C.; Peters, R. J. B.; Janssen, H. G.; Nielen, M. W. F. Microplastics and Nanoplastics in Food, Water, and Beverages; Part I. Occurrence. *TrAC - Trends in Analytical Chemistry*. Elsevier B.V. February 1, 2023. <https://doi.org/10.1016/j.trac.2022.116670>.
- (3) 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>.
- (4) Napper, I. E.; Davies, B. F. R.; Clifford, H.; Elvin, S.; Koldewey, H. J.; Mayewski, P. A.; Miner, K. R.; Potocki, M.; Elmore, A. C.; Gajurel, A. P.; Thompson, R. C. Reaching New Heights in Plastic Pollution—Preliminary Findings of Microplastics on Mount Everest. *One Earth* **2020**, 3 (5), 621–630. <https://doi.org/10.1016/j.oneear.2020.10.020>.
- (5) Lomonaco, T.; Manco, E.; Corti, A.; La Nasa, J.; Ghimenti, S.; Biagini, D.; Di Francesco, F.; Modugno, F.; Ceccarini, A.; Fuoco, R.; Castelvetro, V. Release of Harmful Volatile Organic Compounds (VOCs) from Photo-Degraded Plastic Debris: A Neglected Source of Environmental Pollution. *J Hazard Mater* **2020**, 394, 122596. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2020.122596>.
- (6) Bakir, A.; Rowland, S. J.; Thompson, R. C. Enhanced Desorption of Persistent Organic Pollutants from Microplastics under Simulated Physiological Conditions. *Environmental Pollution* **2014**, 185, 16–23. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2013.10.007>.
- (7) Brennecke, D.; Duarte, B.; Paiva, F.; Caçador, I.; Canning-Clode, J. Microplastics as Vector for Heavy Metal Contamination from the Marine Environment. *Estuar Coast Shelf Sci* **2016**, 178, 189–195. <https://doi.org/10.1016/j.ecss.2015.12.003>.
- (8) Zettler, E. R.; Mincer, T. J.; Amaral-Zettler, L. A. Life in the “Plastisphere”: Microbial Communities on Plastic Marine Debris. *Environ Sci Technol* **2013**, 47 (13), 7137–7146. <https://doi.org/10.1021/es401288x>.
- (9) Bank, M. S.; Ok, Y. S.; Swarzenski, P. W. Microplastic’s Role in Antibiotic Resistance. *Science (1979)* **2020**, 369 (6509), 1315–1315. <https://doi.org/10.1126/science.abd9937>.
- (10) Mattsson, K.; Ekvall, M. T.; Hansson, L.-A.; Linse, S.; Malmendal, A.; Cedervall, T. Altered Behavior, Physiology, and Metabolism in Fish Exposed to Polystyrene Nanoparticles. *Environ Sci Technol* **2015**, 49 (1), 553–561. <https://doi.org/10.1021/es5053655>.
- (11) Cedervall, T.; Hansson, L.-A.; Lard, M.; Frohm, B.; Linse, S. Food Chain Transport of Nanoparticles Affects Behaviour and Fat Metabolism in Fish. *PLoS One* **2012**, 7 (2), e32254. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0032254>.
- (12) Cox, K. D.; Covernton, G. A.; Davies, H. L.; Dower, J. F.; Juanes, F.; Dudas, S. E. Human Consumption of Microplastics. *Environ Sci Technol* **2019**, 53 (12), 7068–7074. <https://doi.org/10.1021/acs.est.9b01517>.
- (13) Liu, J. F.; Liu, X.; Li, Q. C.; Lai, Y. J.; Yu, S. J.; Li, P.; Zhou, X. X.; Dong, L. J.; Liu, X.; Yao, Z. W. Sequential Isolation of Microplastics and Nanoplastics in Environmental Waters by Membrane

- Filtration, Followed by Cloud- Point Extraction. *Anal Chem* **2021**, 93 (10), 4559–4566. <https://doi.org/10.1021/acs.analchem.0c04996>.
- (14) Zhou, X. X.; Hao, L. T.; Wang, H. Y. Z.; Li, Y. J.; Liu, J. F. Cloud-Point Extraction Combined with Thermal Degradation for Nanoplastic Analysis Using Pyrolysis Gas Chromatography-Mass Spectrometry. *Anal Chem* **2019**, 91 (3), 1785–1790. <https://doi.org/10.1021/acs.analchem.8b04729>.
 - (15) Ter Halle, A.; Jeanneau, L.; Martignac, M.; Jardé, E.; Pedrono, B.; Brach, L.; Gigault, J. Nanoplastic in the North Atlantic Subtropical Gyre. *Environ Sci Technol* **2017**, 51 (23), 13689–13697. <https://doi.org/10.1021/acs.est.7b03667>.
 - (16) Liu, J.; Liu, R.; Yin, Y.; Jiang, G. Triton X-114 Based Cloud Point Extraction: A Thermoreversible Approach for Separation/Concentration and Dispersion of Nanomaterials in the Aqueous Phase. *Chemical Communications* **2009**, No. 12, 1514. <https://doi.org/10.1039/b821124h>.
 - (17) Gagné, F.; Auclair, J.; Quinn, B. Detection of Polystyrene Nanoplastics in Biological Samples Based on the Solvatochromic Properties of Nile Red: Application in Hydra Attenuata Exposed to Nanoplastics. *Environmental Science and Pollution Research* **2019**, 26 (32), 33524–33531. <https://doi.org/10.1007/s11356-019-06501-3>.
 - (18) Torrent, L.; Laborda, F.; Marguí, E.; Hidalgo, M.; Iglesias, M. Combination of Cloud Point Extraction with Single Particle Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry to Characterize Silver Nanoparticles in Soil Leachates. *Anal Bioanal Chem* **2019**, 411 (20), 5317–5329. <https://doi.org/10.1007/s00216-019-01914-y>.

ANEXOS

A) Optimizaciones con PS fluorescente (4.1.1.)



Anexo A1 – Señales frente a concentración de TX-114 y ajuste mediante regresión lineal. Condiciones de medida: 900 V, $\lambda_{exc} = 524 \text{ nm}$ y $\lambda_{em} = 571 \text{ nm}$

B) Determinación de la concentración de PS mediante CPE y medida de fluorescencia con RN (4.4.)

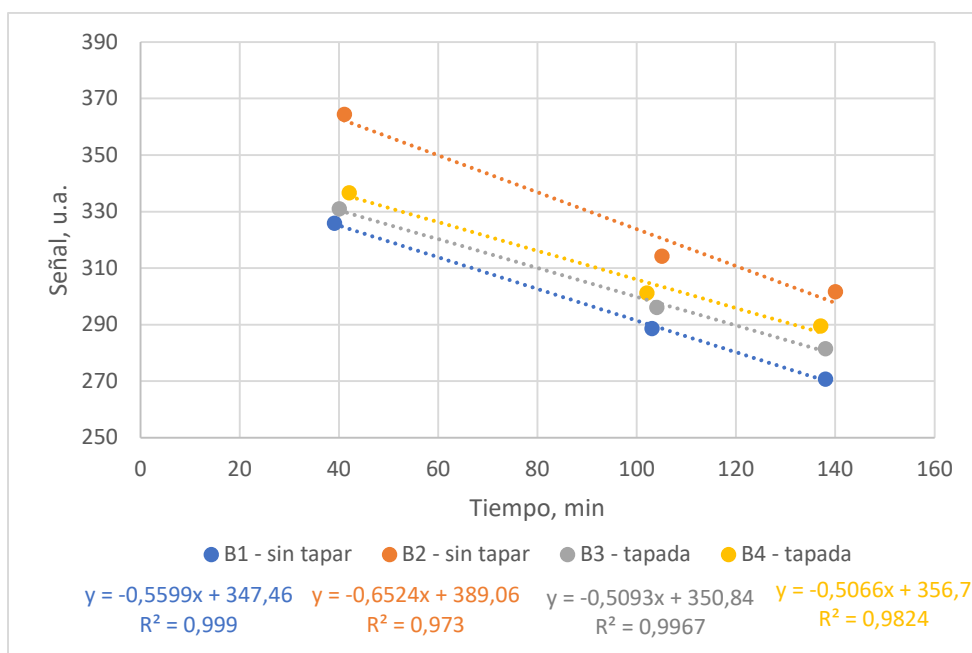
Análisis de varianza de un factor					
RESUMEN					
Grupos	Cuenta	Suma	Promedio	Varianza	
Columna 1	3	1109,55106	369,850352	31,4880814	
Columna 2	4	1359,69141	339,922853	116,455373	
ANÁLISIS DE VARIANZA					
Fuente de la variación		Suma de cuadrados	Libertad de los cuadrados	F	Probabilidad > F crítica para F
Entre grupos	1	1535,40885	1	1535,40885	0,00760743
Dentro de los grupos	5	82,4684564	5		
Total	6	1947,75113	6		
F experimental > F crítico					
Hipótesis nula se rechaza: las medias muestrales difieren significativamente					

Anexo B1 – Análisis de varianza de un factor mediante Excel.

Prueba t para dos muestras suponiendo varianzas desiguales		
	Variable 1	Variable 2
Media	369,850352	339,922853
Varianza	31,4880814	116,455373
Observaciones	3	4
Diferencia hipotética de las medias	0	
Grados de libertad	5	
Estadístico t	4,7551991	
P(T<=t) una cola	0,00254051	
Valor crítico de t (una cola)	2,01504837	
P(T<=t) dos colas	0,00508102	
Valor crítico de t (dos colas)	2,57058184	
t < t crítico		
Hipótesis nula se rechaza: las diferencias entre la señal de blanco y las de las muestras son significativas		

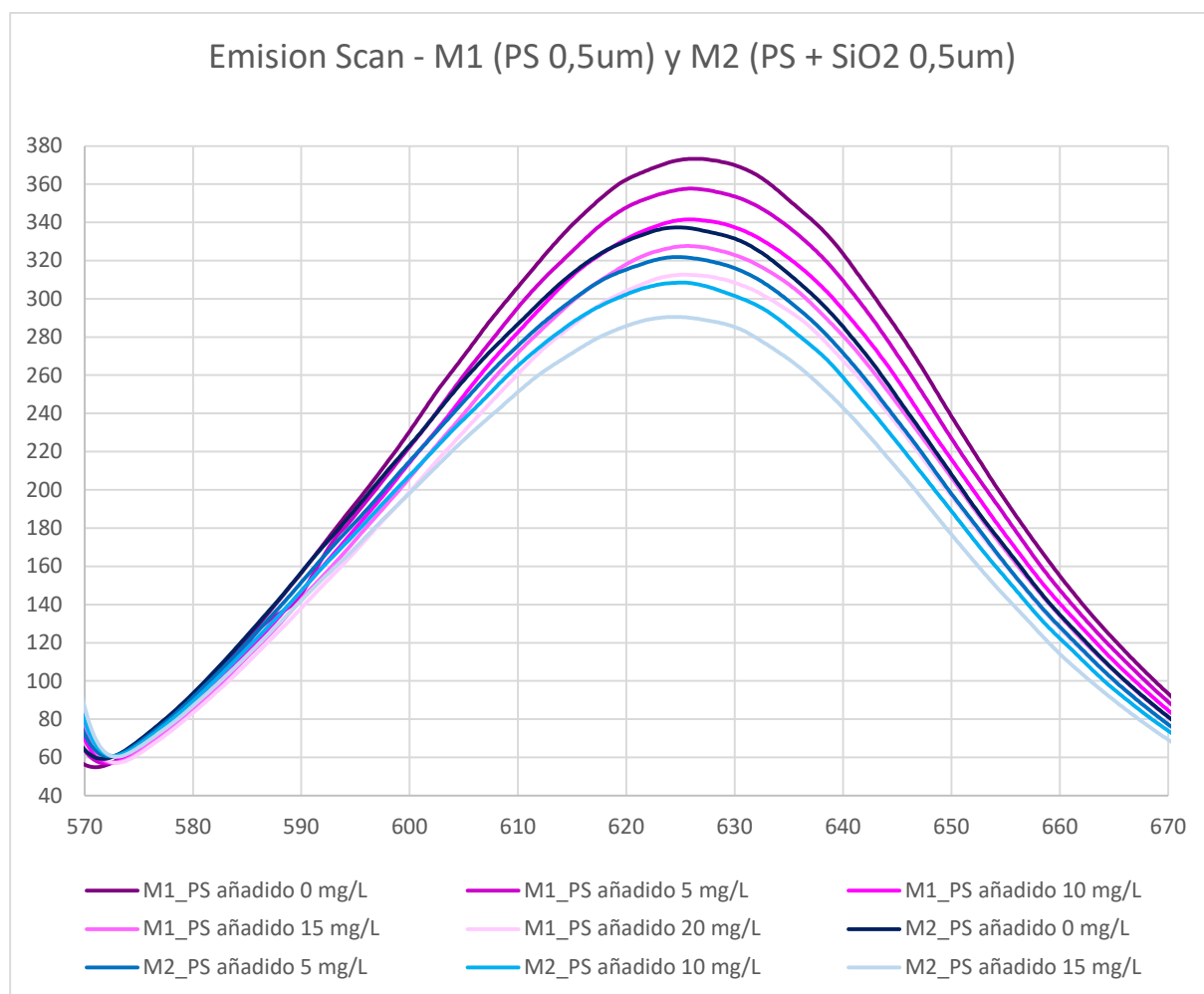
Anexo B2 – Test t mediante Excel.

C) Estudio de las variables que afectan a la precisión (4.4.3.1.)



Anexo C1 – Regresiones lineales de blancos frente al tiempo. Suspensiones de RN (1,6 mg/L) y TX-114 (0,1%). B3 y B4 tapadas con papel de aluminio. Condiciones de medida: 775 V, $\lambda_{exc} = 555 \text{ nm}$ y $\lambda_{em} = 628 \text{ nm}$

D) Evaluación de la selectividad frente a otras micropartículas. Ensayo con partículas de óxido de silicio (4.4.3.4.)



Anexo D1 – Espectros de fluorescencia (775V). Barridos de emisión (575-690 nm; $\lambda_{exc} = 524$ nm). Suspensiones de PS 0,5 μ m 5 mg/L, SiO₂ 0,5 μ m (M1) 0,0 mg/L (M2) 5,0 mg/L, en presencia de RN (M1) 1,40 mg/L (M2) 1,6 mg/L y TX-114 (0,1%). Se realiza adición estándar sobre ambas muestras.