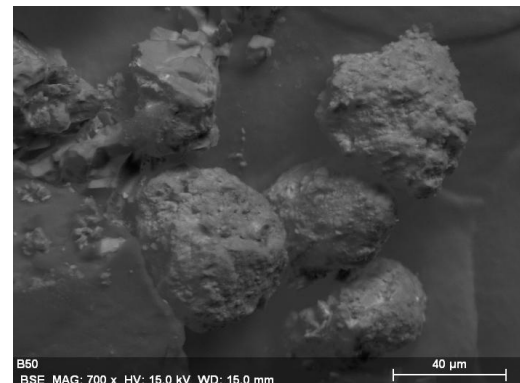
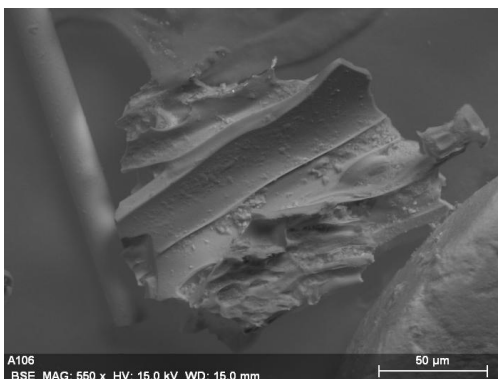
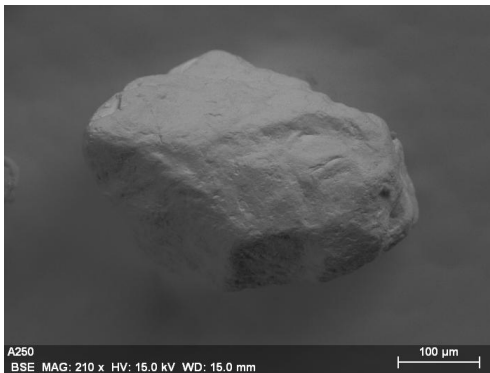




**TRABAJO Fin de Máster**  
**Curso 2013-2014**  
**Máster en Ingeniería Ambiental y Procesos Sostenibles**  
**Escuela Técnica Superior de Ingeniería Industrial (ETSII)**

**ANÁLISIS Y CARACTERIZACIÓN DE MICROPLÁSTICOS PRESENTES EN  
LIMPIADORES FACIALES Y SU IMPACTO SOBRE EL MEDIO AMBIENTE.**



**Andrés David Martínez García.**

**Director: Francisco Javier Bayo Bernal.**

## **Agradecimientos.**

En primer lugar me gustaría agradecer a Javier Bayo Bernal, su apoyo incondicional en este proyecto. Gracias por aconsejarme, guiarme y asesorarme en todo momento.

Agradecer al Departamento de Ingeniería Química y Ambiental la disposición de todos los espacios y materiales necesarios, así como, la resolución de numerosas dudas e inquietudes.

A mi familia y compañeros por todo el apoyo moral que he recibido sobre todo en los momentos más complicados, gracias por estar siempre conmigo.

Finalmente a mi novia Carmen, por ayudarme en todo momento y sobre todo por alentarme a continuar y nunca tirar la toalla.

Muchas gracias.

## Índice.

<b>Abstract</b> .....	8
<b>1. Objetivos</b> .....	11
<b>2. Antecedentes</b> .....	13
<b>2.1. Contextualización</b> .....	13
<b>2.2. Microplásticos. Origen, tipos y deposición</b> .....	14
<b>2.3. Factores que afectan a la toxicidad y biodisponibilidad de los microplásticos. Principales efectos sobre el medio ambiente</b> .....	15
<b>2.4. Características del polietileno</b> .....	17
<b>2.4.1. Principales características de los polímeros</b> .....	20
<b>2.4.2. Teoría del efecto de rellenos y refuerzos</b> .....	21
<b>3. Materiales y Métodos</b> .....	25
<b>3.1. Composición química de las muestras</b> .....	27
<b>3.2. Extracción de los microplásticos</b> .....	28
<b>3.3. Aplicación de distintas técnicas analíticas</b> .....	31
<b>3.3.1. SEM-EDX</b> .....	31
<b>3.3.1.1. Fundamento de la microscopía electrónica de barrido</b> .....	31
<b>3.3.1.2. Equipo e instrumentación</b> .....	32
<b>3.3.1.3. Aplicaciones</b> .....	35
<b>3.3.1.4. Requisitos de las muestras</b> .....	35
<b>3.3.2. Espectroscopía de dispersión de rayos x</b> .....	35
<b>3.3.2.1. Equipamiento</b> .....	36
<b>3.3.2.2. Aplicaciones</b> .....	37
<b>3.3.3. Mastersizer 2000</b> .....	37
<b>3.3.3.1. Equipamientos</b> .....	38
<b>3.3.4. Espectroscopía infrarroja con transformada de Fourier</b> .....	40
<b>3.3.4.1. Equipamiento</b> .....	42
<b>3.3.4.2. Aplicaciones</b> .....	42

<b>3.3.5. Microtox® . Introducción.....</b>	<b>43</b>
<b>3.3.5.1. <i>Vibrio fischeri</i>.....</b>	<b>43</b>
<b>3.3.5.2. Concepto de toxicidad, tipos y medidas de la misma. ....</b>	<b>44</b>
<b>3.3.5.3. Fundamento del método.....</b>	<b>45</b>
<b>3.3.5.4. Realización del bioensayo.....</b>	<b>46</b>
<b>3.3.5.5. Principales aplicaciones:.....</b>	<b>53</b>
<b>3.3.5.6. Interferencias .....</b>	<b>53</b>
<b>3.3.5.7. Límites de vertido. ....</b>	<b>54</b>
<b>4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....</b>	<b>55</b>
<b>4.1. SEM-EDX.....</b>	<b>56</b>
<b>4.2. Dispersión de rayos x. ....</b>	<b>59</b>
<b>4.3. Mastersizer 2000 .....</b>	<b>65</b>
<b>4.4. FTIR.....</b>	<b>67</b>
<b>4.5. MICROTOX" .....</b>	<b>73</b>
<b>5. Conclusiones.....</b>	<b>81</b>
<b>6. Bibliografía. ....</b>	<b>83</b>

## Índice de figuras.

<b>Fig.1. Evolución histórica de la producción de plásticos. Fuente Plastics Europe., 2012.....</b>	<b>13</b>
<b>Fig.2. Principales mecanismos de difusión de los microplásticos e interacciones biológicas. Fuente: Wright <i>et al.</i>, 2013. ....</b>	<b>16</b>
<b>Fig.3. Ingestión de microplásticos por mejillones (<i>Mytilus edulis</i>. Fuente: Browne <i>et al.</i>, 2008. ....</b>	<b>17</b>
<b>Fig.4. Estructura ampliada del polietileno de alta densidad. Fuente: Seymour and Carraher (2002). ....</b>	<b>18</b>
<b>Fig.5. Figura estructural simulada de un polietileno de baja densidad ramificado. Fuente: Seymour and Carraher (2002). ....</b>	<b>19</b>

<b>Fig.6. Estructura esquemática de polímeros de lineales, ramificados y entrecruzados. Fuente: Seymour and Carraher (2002).</b> .....	19
<b>Fig.7. Diagrama de flujo del proceso de estudio de microplásticos en cosméticos.</b> .....	26
<b>Fig.8. Pesada de las muestras en balanza de precisión.</b> .....	28
<b>Fig.9. Agitación magnética de la muestra.</b> .....	29
<b>Fig.10. Proceso de cribado de la muestra y posición de los tamices.</b> .....	30
<b>Fig.11. Secado de las muestras en la estufa.</b> .....	30
<b>Fig.12. Microplásticos extraídos de las muestras A y B.</b> .....	31
<b>Fig.13. Microscopio electrónico de barrido. Fuente: SAIT UPCT.</b> .....	33
<b>Fig.14. Accesorio criogénico. Fuente: SAIT UPCT.</b> .....	34
<b>Fig.15. Master Sizer 2000LF de Malvern Instruments. Fuente: SAIT UPCT.</b> .....	38
<b>Fig.16. Principales picos característicos de absorción en infrarrojo. Fuente: Rosas and Fernández., (2012).</b> .....	40
<b>Fig.17. Espectrofotómetro de absorción infrarroja. Fuente: SAIT UPCT.</b> .....	42
<b>Fig.18. Clasificación de los efectos tóxicos. Fuente: Weyer, (1995).</b> .....	44
<b>Fig.19. Ecuaciones del proceso de luminiscencia. Fuente: Xioyan <i>et al.</i>, (2014).</b> 45	
<b>Fig.20. Sistema Microtox® Modelo 500</b> .....	47
<b>Fig.21. Preparación de la muestra (pesada y suspensión).</b> .....	48
<b>Fig.22. Preparación de la muestra (Agitación).</b> .....	48
<b>Fig.23. Preparación de la muestra (filtrado).</b> .....	48
<b>Fig.24. Lixiviados y blanco.</b> .....	49
<b>Fig.25. Esquema analizador de toxicidad.</b> .....	49
<b>Fig.26. Esquema de las diluciones.</b> .....	50
<b>Fig.27. Porcentaje de dilución de cada muestra original</b> .....	50
<b>Fig.28. Bacterias reconstituidas.</b> .....	50
<b>Fig.29. Parámetros y condiciones a seguir para el desarrollo del SPT con la bacteria marina <u>Vibrio Fischeri</u>. Fuente: Casado <i>et al</i> (2006).</b> .....	51
<b>Fig.30. Variación de color y tamaño en microplásticos. Fuente: Eriksen <i>et al.</i>, (2013).</b> .....	55

<b>Fig.31. Fotografías de microplásticos obtenidos de la muestra A.</b> .....	56
<b>Fig.32. Fotografías de microplásticos obtenidos de la muestra B.</b> .....	57
<b>Fig.33. Fotografías de microplásticos obtenidos de la muestra C.</b> .....	57
<b>Fig.34. Fotografías de los microplásticos obtenidos de la muestra D.</b> .....	58
<b>Fig.35. Difractograma de la muestra A.</b> .....	59
<b>Fig.36. Difractograma de la muestra B.</b> .....	60
<b>Fig.37. Difractograma de la muestra C</b> .....	61
<b>Fig.38. Difractograma de la muestra D.</b> .....	62
<b>Fig.39. Distribución del tamaño de partículas de las diferentes muestras analizadas.</b> .....	66
<b>Fig.40. Espectro de absorción de la muestra A.</b> .....	68
<b>Fig.41. Espectro de absorción de la muestra B</b> .....	68
<b>Fig.42. Espectro de absorción de la muestra C</b> .....	69
<b>Fig.43. Espectro de absorción de la muestra D.</b> .....	69
<b>Fig.44. Principales picos de absorción de compuestos alifáticos. Fuente: Chemistry webBook</b> .....	72
<b>Fig.45. Principales picos de absorción de compuestos del oxígeno. Fuente: Chemistry webBook</b> .....	72
<b>Fig.46. Evolución de la luminiscencia en el ensayo microtox®. Muestra A.</b> .....	74
<b>Fig.47. Evolución de la luminiscencia en el ensayo microtox®. Muestra B.</b> .....	75
<b>Fig.48. Evolución de la luminiscencia en el ensayo microtox®. Muestra C.</b> .....	75
<b>Fig.49. Evolución de la luminiscencia en el ensayo microtox®. Muestra D.</b> .....	76
<b>Fig.50. Toxicidad de las distintas muestras y límite de vertido.</b> .....	77

## Índice de Figuras.

<b>Tabla.1. Principales rellenos de polímeros. Extraída y modificada de Seymour and Carraher (2002).</b> .....	24
<b>Tabla.2. Precios de las muestras estudiadas.</b> .....	28
<b>Tabla.3. Medidas de los tamices, expresadas en diferentes unidades.</b> .....	29

<b>Tabla.4. Límites de vertidos en diferentes localidades españolas.....</b>	<b>54</b>
<b>Tabla 5. Composición química de los microplásticos de la muestra A.....</b>	<b>59</b>
<b>Tabla 6. Composición química de los microplásticos de la muestra B.....</b>	<b>60</b>
<b>Tabla 7. Composición química de los microplásticos de la muestra C.....</b>	<b>61</b>
<b>Tabla 8. Composición química de los microplásticos de la muestra D.....</b>	<b>62</b>
<b>Tabla 9. Composición química de los microplásticos estudiados. ....</b>	<b>63</b>
<b>Tabla 11. Ensayo microtox® muestra A.....</b>	<b>74</b>
<b>Tabla 12. Ensayo microtox® muestra B.....</b>	<b>74</b>
<b>Tabla 13. Ensayo microtox® muestra C.....</b>	<b>75</b>
<b>Tabla 14. Ensayo microtox® muestra D.....</b>	<b>76</b>
<b>Tabla 15. Concentración letal 50 de las diferentes muestras obtenida mediante el ensayo microtox®.....</b>	<b>76</b>
<b>Tabla 16. Toxicidad de las diferentes muestras obtenida mediante el ensayo microtox®.....</b>	<b>77</b>

## **Abstract.**

La presencia de microplásticos (<5 mm Ø) en productos cosméticos y en artículos de aseo, forma parte de nuestra vida y rutina diaria, encontrándolos en jabones, pasta de dientes y limpiadores faciales (Fendall and Swell., 2009).

Inicialmente, todos estos compuestos eran formulados con exfoliantes naturales de carácter abrasivo, principalmente huesos triturados de diferentes frutas, pero el uso cada vez más frecuente de estos limpiadores por los consumidores de clase media de los países desarrollados, ha obligado a la industria a utilizar masivamente microplásticos como exfoliantes o blanqueadores en formulaciones cosméticas.

En muchos casos, los microplásticos se consideran bioquímicamente inertes, pero no los aditivos utilizados en su fabricación, llamados "plastificantes", que cambian sus propiedades para aumentar su vida media, otorgándole plasticidad, resistencia al calor o a la degradación microbiana (Cole *et al.*, 2011). Además, su pequeño tamaño hace que sea tomado como alimento por el fitoplancton microscópico, entrando en la cadena alimentaria, que en última instancia, podría afectar a los seres humanos.

Su pequeño tamaño también hace que sean difíciles de eliminar en una planta de tratamiento de aguas residuales convencional. Este trabajo analiza las principales características estructurales, de composición, distribución del tamaño de partícula y ecotoxicidad de los microplásticos presentes en cuatro limpiadores faciales.

Se ha realizado microscopía electrónica de barrido, junto con el análisis de dispersión de rayos X de energía (SEM-EDX) usando un microscopio electrónico de barrido Hitachi s-3500N, para estudiar la forma de los microplásticos. Su composición elemental se estableció con un analizador EDX QUANTAX 200 acoplado a la SEM, y un Mastersizer 2000 (Malvern, Worcs, Reino Unido) este instrumento de difracción láser se utilizó para conocer la superficie específica y la distribución del tamaño.



Finalmente, la toxicidad aguda se evaluó mediante la determinación de la inhibición de luminiscencia de la bacteria marina Gram-negativa *Vibrio fischeri* (cepa NRRL B-11177), por medio del analizador Microtox® 500.

Los microplásticos contenidos en los cuatro limpiadores faciales muestra una gran variedad de áreas superficiales específicas, con una media mínima de 0,06 m<sup>2</sup> / g para el gel exfoliante C, hasta un máximo promedio de 5,34 m<sup>2</sup> / g para el limpiador facial A. Es evidente que, incluso para los más bajos, estas partículas podrían actuar como absorbentes en el medio ambiente, llevando contaminantes orgánicos o metales pesados, en comparación con bioabsorbentes utilizados en otros experimentos (Bayo, 2012), y siempre con mecanismo doble (físico y químico).

Las distribuciones de partícula medias fueron: 87,91 M (marca A), 73,60 M (marca B), 115,07 M (marca C), 185,15 M (marca D). En el microscopio electrónico de barrido, las partículas microplásticas mostraron una variedad de formas irregulares, incluyendo elipses, formas granulares y fragmentos completamente irregulares, como se ha descrito previamente por otros autores en muestras similares (Fendall y Sewell, 2009).

La composición de estos microplásticos ha incluido dióxido de titanio, usado como un ingrediente (protector solar) en muchos cosméticos. Algunos de ellos incluyen aluminio, así como de elementos traza como el cromo, cloro, o hierro. Los análisis de Microtox® mostraron variabilidad ecotoxicológica según la composición y propiedades de lixiviación elementales del microplástico.



## 1. Objetivos.

### *General:*

El presente trabajo tiene como objetivo principal la caracterización de los microplásticos presentes en productos de limpieza facial de elevado consumo, así como su importancia y destino una vez que han pasado a formar parte del agua residual.

### *Específicos:*

1. Realizar un estudio morfométrico de los microplásticos contenidos en los limpiadores faciales objeto de estudio mediante microscopía electrónica de barrido (Scanning electron microscopy – SEM).
2. Analizar la composición química elemental de este material mediante espectroscopía dispersiva de rayos X (Energy dispersive X-ray spectroscopy – EDX).
3. Determinar la distribución media de tamaños y superficie específica de los microplásticos mediante dispositivo Mastersizer 2000.
4. Examinar los principales grupos funcionales presentes en las muestras mediante espectroscopía infrarroja con transformada de Fourier (Fourier transform infrared spectroscopy – FTIR).
5. Valorar la posible ecotoxicidad aguda de los microplásticos mediante análisis de Microtox<sup>®</sup>.
6. Estimar los efectos que, en base a sus características físico-químicas y de toxicidad, estos microcomponentes pueden ejercer sobre el medio ambiente.



## 2. Antecedentes

### 2.1. Contextualización.

Las aguas superficiales y en especial el medio marino están recibiendo, actualmente, una gran cantidad y variedad de contaminantes de origen antropogénico.

Entre todos los contaminantes que podemos encontrar cabe destacar la presencia y abundancia de plásticos y compuestos derivados de los mismos. Los plásticos son polímeros orgánicos sintéticos que provienen de la polimerización de monómeros extraídos del gas o del petróleo (Derraik., 2002, Rios *et al.*,2007), por lo tanto, su composición química es muy variada produciendo diferentes afecciones al medio ambiente.

La producción anual de plásticos y compuestos de plástico ha seguido incrementándose en los últimos años, a pesar de la crisis económica que está afectando a los países de la zona euro. Gran importancia han tenido los países emergentes (china, Japón...) en la obtención de la máxima producción mundial de plásticos registrada hasta el momento, 288 Mtonne en 2012 (PlasticsEurope, 2012).

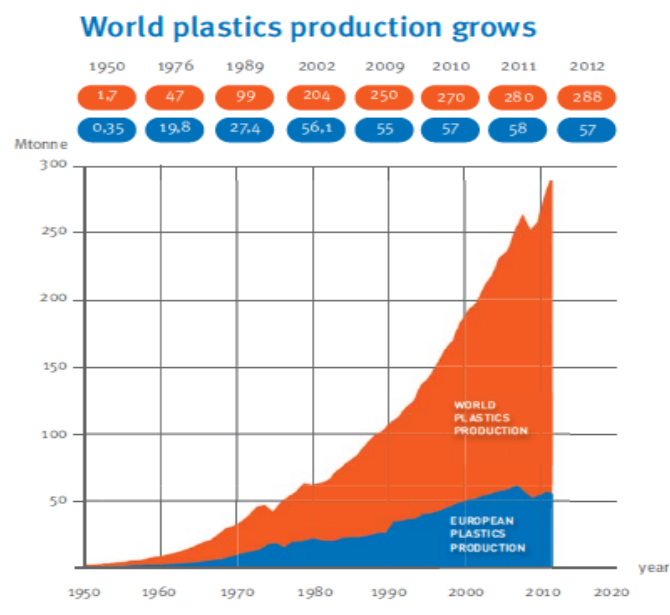


Fig.1. Evolución histórica de la producción de plásticos. Fuente Plastics Europe., 2012.

## **2.2. Microplásticos. Origen, tipos y deposición.**

Los microplásticos son pequeñas partículas de polímeros (generalmente polietileno, poliestireno o polipropileno) con un diámetro <5 mm y cuyo origen en el medio ambiente puede ser causado por varias causas.

Para algunos autores el origen de los microplásticos está en que forman parte de la composición de numerosos productos industriales, son los denominados Microplásticos primarios (Cole *et al.*, 2011). Otros autores consideran el origen principal de los microplásticos en la descomposición y fragmentación de macroplásticos (Andrady., 2011; Cole *et al.*, 2011) y son llamados Microplásticos secundarios.

La diversidad de puntos de partida y distribución de los microplásticos van a dificultar de sobremano implantar de forma eficaz, diferentes técnicas para su control, retención y/o eliminación. Además en los últimos años se ha generalizado el uso de microplásticos en productos cosméticos como pueden ser jabones, limpiadores faciales e incluso dentífricos, formando parte de nuestra vida cotidiana (Fendall y Sewell, 2009).

Esta globalización del uso de microplásticos, en sustitución de exfoliantes naturales (Moore, 2008), ha producido un incremento del consumo en los distintos sectores industriales, que unido a su pequeño tamaño, impide que sean retenidos por los mecanismos actuales de depuración, convirtiéndolo en un contaminante mayoritario del medio marino (Browne *et al.*, 2007).

La composición química de los microplásticos va a influir de manera muy significativa en el lugar de deposición de los mismos. Por tanto, microplásticos con densidad grande (mayor que la del agua) van a ser depositados en las cercanías del punto de vertido, aunque a través de corrientes sub-superficiales pueden ser transportados a otros lugares (Engler, 2012). Finalmente, la mayoría de microplásticos van a terminar en los océanos marinos, ya sea, formando parte de los sedimentos o suspendidos en la columna de agua.

La concentración de los microplásticos en los distintos océanos terrestres, es bastante dispar, alcanzando una concentración de 100.002 partículas/m<sup>3</sup> en las

costas de Suecia (Noren and Naustvoll, 2010) a 6 partículas/m<sup>3</sup> en las costas de Portugal (Martins and Sobral, 2011).

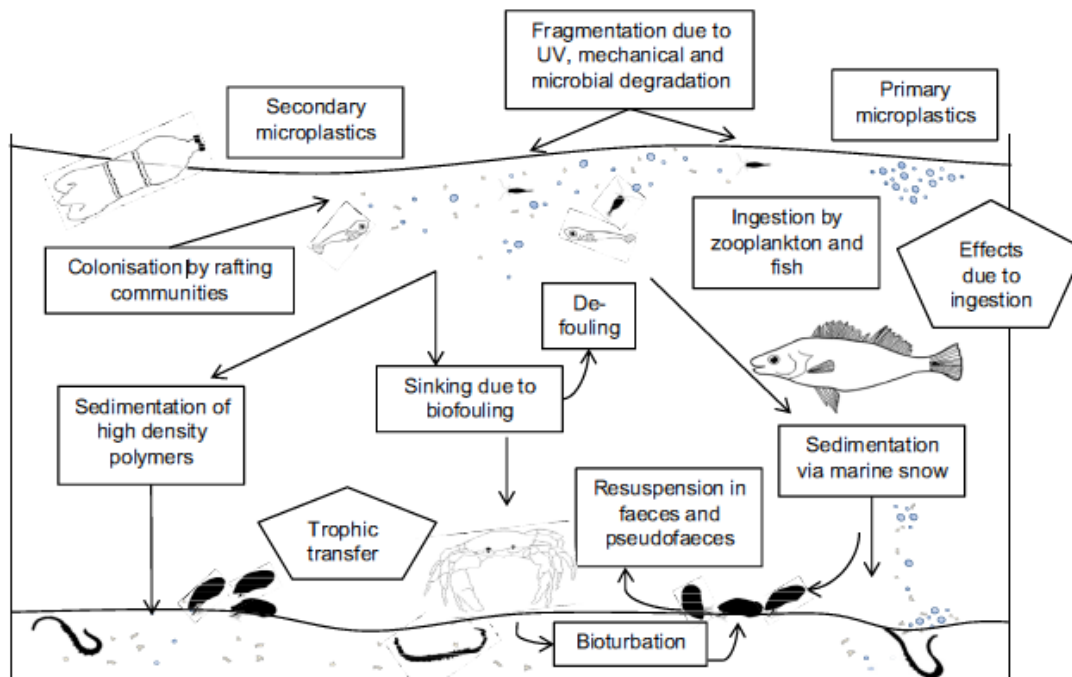
### **2.3. Factores que afectan a la toxicidad y biodisponibilidad de los microplásticos. Principales efectos sobre el medio ambiente.**

1. El tamaño de los microplásticos va a ser fundamental para producir efectos sobre los distintos organismos. Diversos autores han demostrado que un tamaño pequeño de los microplásticos va a favorecer la ingesta por parte de fitoplactón, zooplacton, organismos bentónicos, y organismos filtradores como mejillones o ballenas.

2. La densidad, tal y como hemos comentado anteriormente va a influir en el traslado y deposición de los mismos.

3. El color de los microplásticos va a influir de manera significativa en las probabilidades de ingestión por parte de los organismos (Wright *et al.*, 2013). Existen algunas especies peces de importancia económica, que son depredadores visuales, los cuales confunden las presas con microplásticos de color amarillo, beige y blanco (Shaw and Day, 1994).

A continuación podemos ver de forma esquemática las interacciones y efectos que potencialmente pueden producir los microplásticos en el medio marino, esta imagen, es extrapolable a todos los cuerpos de agua superficiales.

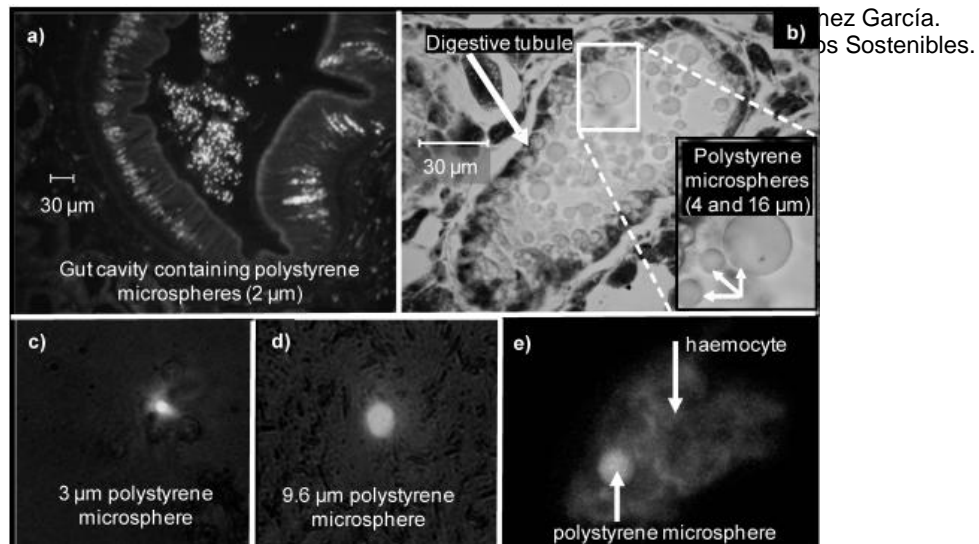


**Fig.2. Principales mecanismos de difusión de los microplásticos e interacciones biológicas. Fuente: Wright *et al.*, 2013.**

Los principales efectos de los microplásticos que se han datado y documentado son:

- Ingesta por diferentes taxones de organismos marinos. De especial interés son los grupos de zooplancton y la dinámica que muestran en la ingestión de microplásticos, que puede producirse por diferentes vías (exposición directa, a través de otras especies de plancton). Además las microesférulas plásticas pueden acumularse a través del plancton y llegar hasta otros organismos superiores tales como camarones (Setälä *et al.*, 2014). Otros autores han demostrado como pequeños microplásticos de poliestireno pueden ser ingeridos por algunas especies de moluscos (*Mytilus edulis*) (Browne *et al.*, 2008).





**Fig.3. Ingestión de microplásticos por mejillones (*Mytilus edulis*. Fuente: Browne *et al.*, 2008.**

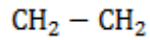
Los microplásticos no sólo afectan a organismos inferiores, sino que pueden afectar a grandes mamíferos, como a la Ballena *Balaenoptera physalus* y ser ingeridos por ellas (Fossi *et al.*, 2012).

- Contaminación de aguas superficiales para consumo humano, y que en la mayoría de casos su eliminación a través de técnicas avanzadas de oxidación y filtración son muy costosas (Benner *et al.*, 2013).
- Contener aditivos que modifican su resistencia térmica, daño oxidativo y degradación microbiana, aumentando su resistencia, toxicidad y durabilidad en el medio (Browne *et al.*, 2007; Thompson *et al.*, 2009).
- Adsorber metales (Ashton *et al.*, 2010), disruptores endocrinos (Ng and Obbard., 2006) y otros contaminantes persistentes y hidrofóbicos (Rios *et al.*, 2007).

#### **2.4. Características del polietileno.**

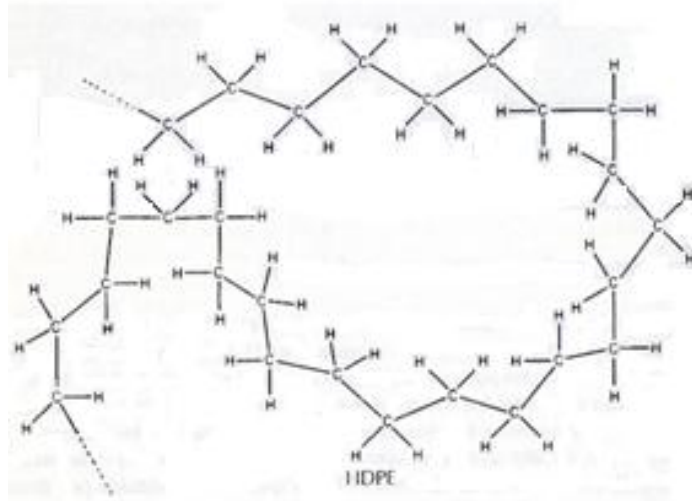
Para entender las técnicas analíticas que hemos aplicado a los microplásticos y los resultados de las mismas es necesario conocer las características y propiedades de la molécula de polietileno.

El polietileno es químicamente el polímero más simple. Los polímeros son macromoléculas que se caracterizan por tener una unidad que se repite a lo largo de la molécula. El polietileno se trata de una molécula lineal no ramificada con la siguiente estructura:



El polietileno se puede clasificar en dos grupos principales:

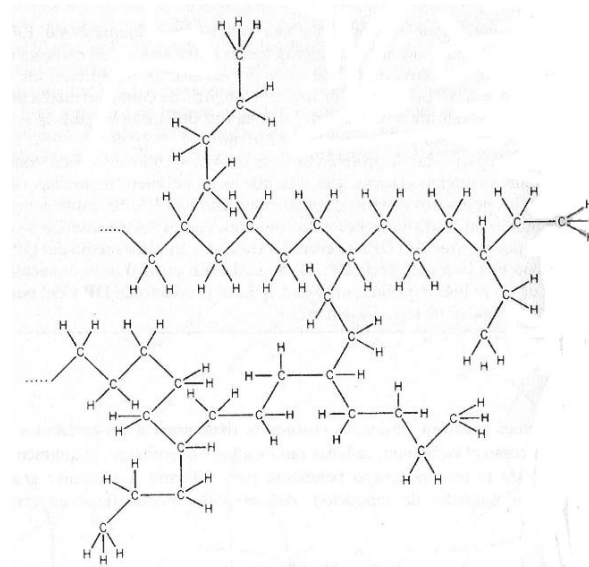
1. El polietileno de alta densidad (HDPE), es una molécula de cadena lineal que está constituida por átomos de carbono concatenados unidos mediante enlaces covalentes. Los átomos de carbono se unen entre sí formando ángulos de enlace tetraédricos característicos ( $109,5^\circ$  aproximadamente). Además la distancia entre átomos de carbono es de 1.54 Angstroms. Debido a la rotación de los enlaces carbono-carbono estas cadenas rara vez se encuentran en forma lineal si no que aparecen formando una gran variedad de formas y conformaciones. Los ejemplos más utilizados de polietilenos de alta densidad son la parafina y el decano.



**Fig.4. Estructura ampliada del polietileno de alta densidad. Fuente: Seymour and Carraher (2002).**

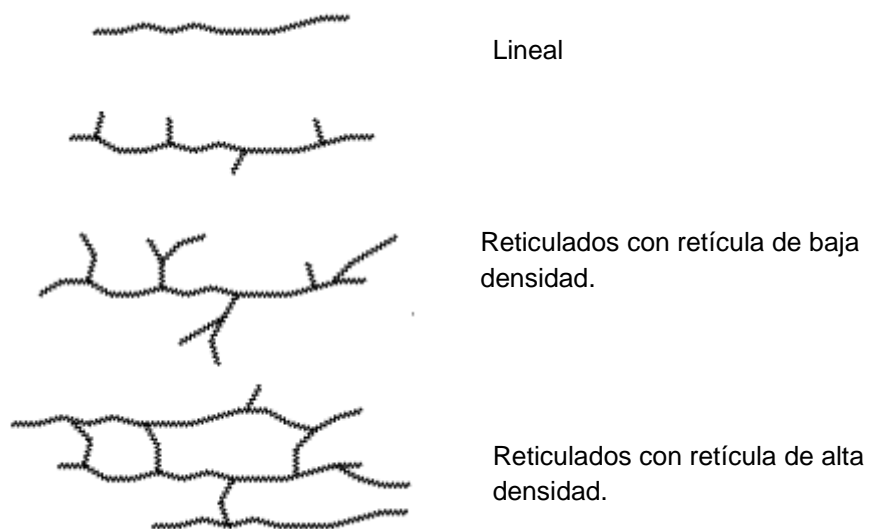
2. El polietileno de baja densidad (LDPE), es un polímero ramificado que presenta extensiones de cadenas o ramas de secuencias de polietileno en diversos puntos de ramificación espaciados irregularmente a lo largo de la cadena. Estas ramificaciones incrementa el volumen y disminuye la densidad del polímero. Los últimos avances científicos y tecnológicos han permitido conseguir, mediante procesos a baja presión, polietilenos

de baja densidad prácticamente lineales. La linealidad suministra resistencia mientras que la ramificación otorga tenacidad.



**Fig.5. Figura estructural simulada de un polietileno de baja densidad ramificado.**  
Fuente: Seymour and Carraher (2002).

Por lo tanto, en cuanto a estructura, los polímeros se pueden clasificar en las siguientes categorías:



**Fig.6. Estructura esquemática de polímeros de lineales, ramificados y entrecruzados.**  
Fuente: Seymour and Carraher (2002).

### **2.4.1. Principales características de los polímeros.**

Temperatura de transición vítrea (Tg): Es aquella temperatura a partir de la cual el polímero adquiere propiedades características del vidrio. Esta temperatura es característica de cada polímero, si el polímero se enfría por debajo de su temperatura de transición vítrea se vuelve rígido y quebradizo. Dependiendo del uso del mismo nos interesará enfriarlo por encima o por debajo de su Tg. Esta temperatura es exclusiva de los polímeros en estado amorfo.

Capacidad Calorífica: Cantidad de calor requerida para incrementar un grado Celsius la temperatura de un gramo de polímero.

Viscosidad: Es la medida de la resistencia al flujo. Es el resultado cooperativo entre segmentos de polímero en estado líquido, se encuentra limitado por el enmarañamiento de cadena, las fuerzas intermoleculares, la presencia de agentes refuerzo y por los enlaces cruzados.

Tacticidad: Distribución de los radicales del polímero en el espacio.

Flexibilidad: En los polímeros amorfos, más allá del estado vítreo, depende de un tipo determinado de movimiento de flexión de los segmentos de las cadenas del polímero. Esta flexibilidad aumenta cuando hay muchos grupos metileno ( $\text{CH}_2$ ) o átomos de oxígeno entre los grupos rigidizantes de la cadena. En cambio esta flexibilidad disminuye si existen en las estructuras del polímero grupos tales como: p-fenileno, amida, sulfona o carbonilo.

Cristalinidad: Cuando la estructura de un polímero es regular, este se empaquetará en forma de cristales. Cualquier defecto que reduzca la regularidad constitucional va a afectar negativamente a esta propiedad.

A medida que aumenta la cristalinidad en un polímero:

- Aumenta la densidad.
- Aumenta la rigidez, resistencia y dureza.
- La resistencia al calor.
- Si el polímero es transparente en estado amorfo, se convierte en un sólido opaco cuando cristaliza.

Resistencia: En los polímeros existen diferentes tipos de resistencia entre los que cabe destacar los siguientes:

- Resistencia a la tracción. Un polímero será resistente a la tracción cuando soporte fuerzas axiales que tienden a alargarlo.
- Resistencia a la compresión. Un polímero será resistente a la tracción cuando soporte fuerzas axiales que tienden a compactarlo.
- Resistencia a la flexión. Los polímeros tendrán resistencia a la flexión si es capaz de soportar cargas que provoquen movimientos flectores en su sección transversal.
- Existen otras resistencias tales como: resistencia al impacto, resistencia a la torsión etc.

#### **2.4.2. Teoría del efecto de rellenos y refuerzos.**

Para terminar de comprender las propiedades que van a albergar los microplásticos es imprescindible conocer la teoría del efecto de rellenos. Las características físicas y químicas de los microplásticos, en la mayoría de casos, van a estar modificadas por la presencia de estos rellenos adicionales.

La norma ASTM-D-833 de la American Society for Testing and Materials, define relleno como: un material relativamente inerte que se incorpora al plástico para modificar su resistencia mecánica, estabilidad, propiedades de uso, u otras características o para reducir su precio. Estos rellenos suelen ser sólidos, esféricos o esferoidales de escaso tamaño. Algunos de estos rellenos como el negro de carbón y la sílice amorfa tienden a formar agrupaciones racimosas de esferas.

En la siguiente tabla podemos observar los principales rellenos que se adicionan a los polímeros.

**Tabla.1. Principales rellenos de polímeros. Extraída y modificada de Seymour and Carraher (2002).**

<b>Principales tipos de rellenos para polímeros</b>	
<b>Materiales orgánicos</b>	<b>Materiales inorgánicos</b>
<u>Productos celulósicos:</u>	<u>Productos de la sílice:</u>
a) Papel Kraft	a) Arena
b) Serraduras	b) Cuarzo
c) Serrín gordo	c) Trípoli
d) Serrín molido	d) Tierra de diatomeas.
<u>Celulosas finamente divididas:</u>	e) Sílice de proceso húmedo
e) Papel cortado	f) Sílice pirogénica
f) Plancha de resina troceada	g) Aerogel de sílice
g) Plancha de crepé	<u>Silicatos:</u>
h) Preformados de pulpa	h) Asbestos
<u>Fibras:</u>	i) Caolinita
i) $\alpha$ -Celulosa.	j) Mica
j) Preformados de pulpa	k) Sienita de nefelina
k) Bolas de algodón	l) Talco
l) Subproductos textiles	m) Wollastonita
m) Yüte	n) Silicato de calcio
n) Henequén	o) Silicato de aluminio
o) Rayón.	<u>Vidrio:</u>
<u>Productos tipo lignina:</u>	p) Escamas de vidrio
p) Corteza molida	q) Esferas de vidrio
q) Lignina procesada	r) Vidrio fibroso
<u>Fibras sintéticas:</u>	<u>Metales.</u>
r) Poliamidas	<u>Filamentos de Boro:</u>
s) Poliésteres	<u>Óxidos metálicos:</u>
t) Poliacrilonitrilo	s) Óxidos de Zinc

<u>Carbono:</u>  u) Negro de carbón v) Carbón de petróleo molido w) Filamentos de grafito x) Whiskers de grafito	t) Alúmina. u) Oxido de torio etc <u>Carbonato de calcio:</u> v) Calizas w) Creta x) Carbonato de calcio precipitado <u>Polifluorurocarbonos</u> <u>Otros rellenos</u>
---	---

Por otro lado, un plástico reforzado es un plástico que alberga propiedades de resistencia muy superiores a la resina básica por la presencia de rellenos de alta resistencia embebidos en la composición. Generalmente se utilizan los refuerzos fibrosos frente a los esféricos debido a que son mucho más eficaces. De todos ellos, cabe destacar la fibra de vidrio, actualmente es el refuerzo más utilizado, y su efecto en el polímero depende de la longitud de la misma, y la unión interfacial entre la fibra y la matriz y la coexistencia con agentes de superficie.

Entre los refuerzos más sofisticados podemos destacar: fibras de carbono, de aramidas, tungsteno, titanio de potasio, zafiro etc.

Para profundizar en el conocimiento de los distintos impactos que pueden producir los microplásticos en el medio acuático y sobre los distintos organismos del ecosistema, hemos analizado y caracterizado los microplásticos presentes en cuatro limpiadores faciales.

Estos cosméticos son de fácil acceso para cualquier consumidor debido a su bajo coste y amplia distribución en las distintas cadenas de supermercados.





### **3. Materiales y Métodos.**

Durante el estudio y caracterización de los microplásticos es necesario seguir una metodología ordenada de cara a obtener resultados óptimos.

Para el estudio de los microplásticos en limpiadores faciales hemos realizado las siguientes fases:

- Elección de las muestras.
- Extracción de los microplásticos.
- Caracterización de los microplásticos a través de cinco técnicas analíticas:
  - Microscopía electrónica de barrido.
  - Dispersión de rayos x.
  - Mastersizer 2000.
  - Espectroscopía infrarroja con transformada de Fourier
  - Microtox®

Todos los pasos y etapas que se han realizado a lo largo de este trabajo fin de máster quedan reflejados de forma esquemática y esclarecedora, en el siguiente diagrama de flujo del proceso.

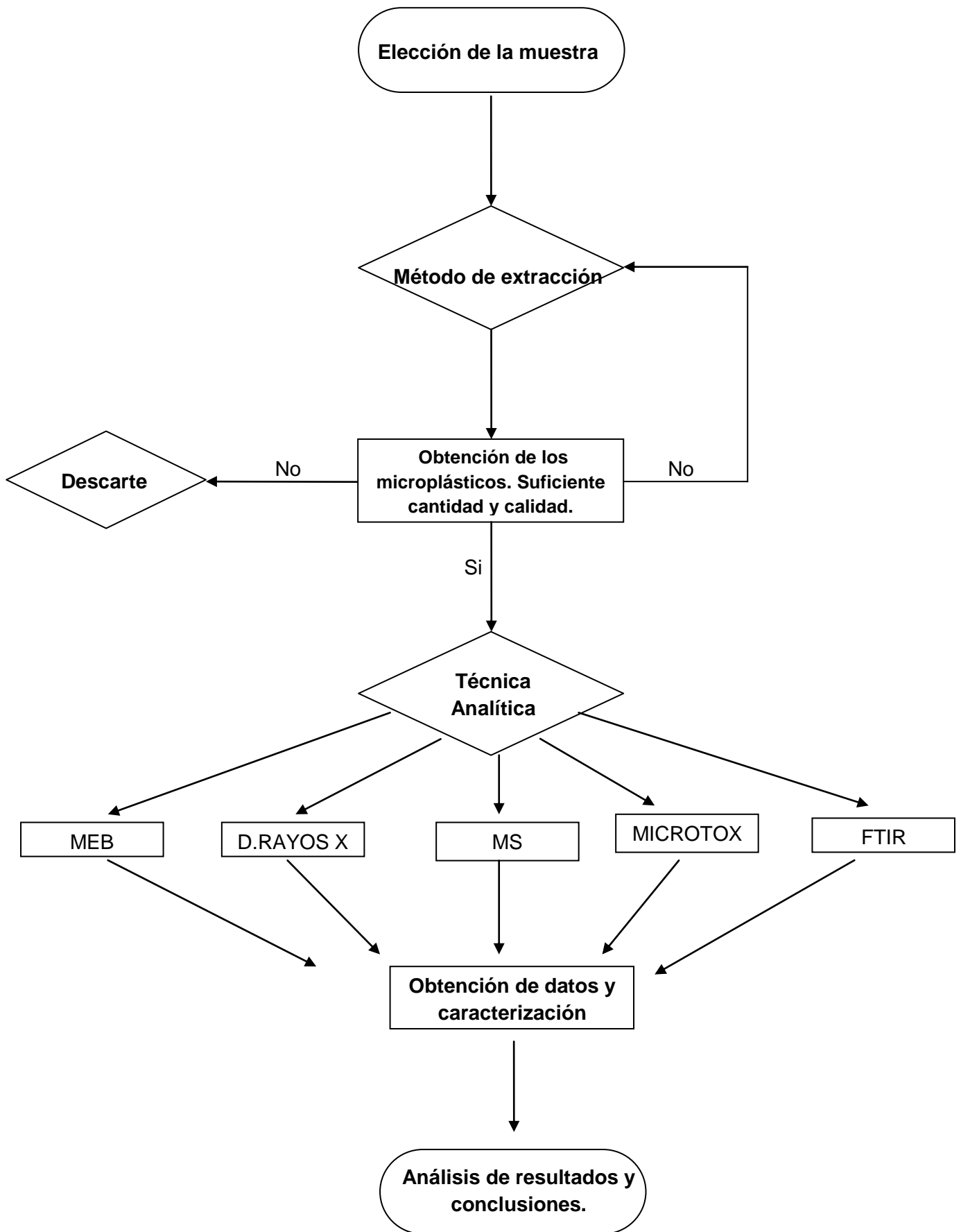


Fig.7. Diagrama de flujo del proceso de estudio de microplásticos en cosméticos.

### **3.1. Composición química de las muestras.**

Para realizar el presente estudio se han seleccionado cuatro muestras de limpiadores faciales (A,B,C,D) cuya composición química se muestra a continuación:

#### Muestra A:

Water, Kaolin, Glycerin, butylene glycol, zea mays starch, corn starch, CI 7789, titanium dioxide, decyl glucoside, polyethylene, sodium laureth sulfate, chondrus crispus (carrageenan), Peg-7 glyceryl cocoate, benzyl salicylate, CI 42090 blue 1 lake, eucalyptus globules extract, eucalyptus globules leaf extract, limonene, linalool, menthol, phenoxyethanol, propylene glycol, pumice, salicylic acid, smithsonite, smithsonite extract, sodium hydroxide, tetrasodium edta, xanthan gum, zinc gluconate, parfum, fragrance (F.I.I. B43449/1).

#### Muestra B:

Aqua, PPG-15 stearyl ether, oxidized polyethylene, Glycerin, stearyl alcohol, cetyl betaine, salicylic acid, distearyldimonium chloride, sodium Lauryl sulfate, myristyl alcohol, PPG-30, BHT, steareth-21, steareth-2, alcohol denat, cetyl alcohol, arachidyl alcohol, behenyl alcohol, disodium edta, parfum, benzyl benzoate, benzyl salicylate, alpha-isomethyl ionene, hexyl cinnamal.

#### Muestra C:

Water, polyethylene, glycerin, sodium laureth sulfate, xanthan gum, PEG-60 hydrogenated castor oil, CI 42090 blue 1, CI 47005, acid yellow, CI 77007, ultramarines, coco-glucoside, decyl glucoside, disodium edta, hidroxipropyl guar, limonene, mentha piperita extract, peppermint leaf extract, salicylic acid, sodium benzoate, sodium lauroyl oat amino acide, solum diatomeae, diatomaceous earth, parfum, fragrance, phenoxyethanol, (FIL B48990/1).

#### Muestra D:

Aqua, polyethylene, carrot extract, fagus silvatica bud extract, hydrolyzed say protein, lactid acid, solanum lycopersicum (tomato), fruit/leaf/stem extract, citrus lemon fruit extract, citrus grandis (grapefruit) fruit extract, vaccinum myrtillus extract, citric acid, malic acid, glycine, alanine, creatine, aloe barbadensis leaf

extract, urea, glycerin, polysorbate f0 80, triethanolamine, propylene glycol, disodium edta, saccharide hydrolysate, parfum, magnesium, iodopropynyl, butylcarbamate, hexyl cinnamol, methylpropialnol, geraniol, limonene, hydroxihexyl, carboxaldehyde, C.I. 19140, C.I. 14720.

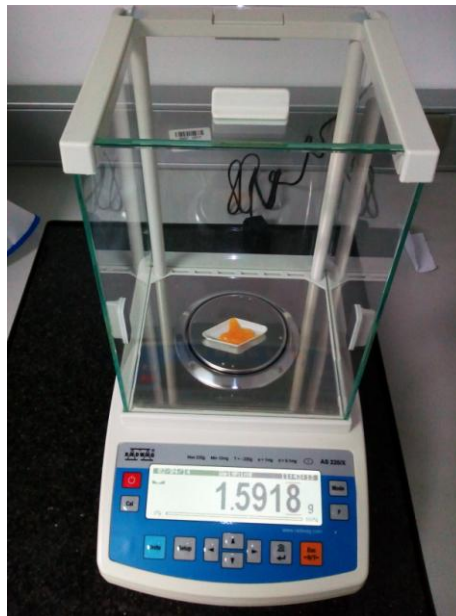
Los limpiadores son de fácil acceso para los ciudadanos, encontrándose en la mayoría de hipermercados locales, con precios relativamente adsequibles.

**Tabla.2. Precios de las muestras estudiadas.**

Muestra	Precio (€/L)
A	39,67
B	27,00
C	53,33
D	106,75

### 3.2. Extracción de los microplásticos.

Pesamos en una balanza de precisión 1,60 g de cada muestra. Posteriormente a la pesada, las distintas muestras se diluyeron en un litro de agua del grifo, a 50°C y con agitación, emulando así las condiciones de uso de estos productos.



**Fig.8. Pesada de las muestras en balanza de precisión.**



**Fig.9. Agitación magnética de la muestra.**

Una vez que la suspensión quedó homogénea, se procedió a cribarla por una serie de tamices con diferente luz de malla, colocando en la base el de menor tamaño.

**Tabla.3. Medidas de los tamices, expresadas en diferentes unidades.**

US Sieve size	Tyler Mesh	Opening (mm)	Opening (in)
Nº 60	60 Mesh	0,250	0,0098
Nº 80	80 Mesh	0,177	0,007
Nº 100	100 Mesh	0,149	0,0059
Nº 140	150 Mesh	0,105	0,0041
Nº 200	200 Mesh	0,074	0,0029
Nº 270	270 Mesh	0,053	0,0021

De esta manera, se consiguió una separación efectiva y sencilla de los microplásticos de las distintas muestras.

Se llevo a cabo una separación por tamaños, en lugar de utilizar únicamente el tamiz de 50  $\mu\text{m}$ , para comprobar posteriormente a través de Microscopía electrónica de Barrido, si existían diferencias entre los distintos tamaños de un mismo microplástico.



Andrés David Martínez García.  
Ambiental y Procesos Sostenibles.

**Fig.10. Proceso de cribado de la muestra y posición de los tamices.**

Tras la separación por tamaño, se procedió al secado de los microplásticos en estufa de desecación a 100° C durante 60 minutos.



**Fig.11. Secado de las muestras en la estufa.**

Después del secado, los microplásticos ya estaban listos para ser almacenados y conservados adecuadamente. Para ello, se colocaron en envases de vidrio con tapón de PVC



Fig.12. Microplásticos extraídos de las muestras A y B.

### 3.3. Aplicación de distintas técnicas analíticas.

#### 3.3.1. SEM-EDX.

Mediante el uso combinado de la microscopía electrónica de barrido y la espectroscopía de dispersión de rayos x (análisis por energía dispersivas de rayos X), vamos a caracterizar las distintas muestras de microplásticos obtenidos.

Para entender mejor estas técnicas vamos a describir el fundamento, instrumentación y principales aplicaciones de las mismas.

##### 3.3.1.1. Fundamento de la microscopía electrónica de barrido.

Las imágenes que obtenemos en el microscopio electrónico de barrido se obtienen debido electrones secundarios o retrodispersados, provenientes de las muestras, como resultado de hacer incidir sobre las mismas un haz de electrones de entre 5 y 30 KeV

Vamos desplazando el haz de electrones sobre la muestra en las direcciones X e Y, de modo que la posición del haz coincide con la aparición de brillo, en un determinado punto de la pantalla.

El numero atómica de la muestra o elementos va a determinar de forma significativa la emisión de electrones retrodispersados. Esta característica nos va a aportar mucha información, ya que, distintas partes de la muestra o distintos compuestos van a revelarse con distinta intensidad aunque no existan diferencias topográficas.

En una pequeña capa superficial de las muestras, de un tamaño del orden de 50 a 100 Å, es donde se van a producir los denominados electrones secundarios. Estos electrones se caracterizan por albergar poca energía (<50eV) y que pueden ser desviados de su trayectoria inicial permitiendo ver o apreciar zonas no disponibles al detector. Esta particularidad nos permite obtener información del relieve de las muestras y/o compuestos.

### **3.3.1.2. Equipo e instrumentación.**

Microscopio electrónico de barrido S-3500N de Hitachi (componentes principales):

A continuación hemos desarrollado un listado de los componentes principales de los que está formado el microscopio electrónico de barrido que hemos utilizado para caracterizar nuestras muestras:

- Cañón de electrones con un voltaje acelerador de 0.5 a 30 Kv, ajustable por pasos
- Fuente de electrones con filamento de W, polarización automática y alineamiento electrónico del cañón.
- Sistemas de lentes con supresión de histéresis. Corriente de sonda con ajuste manual o automático, ajustable de 1 pA a 1 mA. Corrección de astigmatismo manual y electrónica.
- Movimientos motorizados en los ejes X e Y.
- Resolución de imagen de electrones secundarios de al menos 3.0 nm, en modo de alto vacío.
- Resolución de imagen de electrones retrodispersados de al menos 5.0 nm, en modo de presión variable. Este detector trabaja en modo composicional o topográfico.
- Rango de magnificación desde 18x hasta 300.000x, en más de 60 etapas.
- Cámara infrarroja.



- Sistema de vacío con control de evacuación, provisto de una bomba difusora y dos bombas rotatorias.
- Enfoque manual y automático con ajuste grueso y fino. Rastreo automático del foco.



**Fig.13. Microscopio electrónico de barrido. Fuente: SAIT UPCT.**

#### Cámara digital de alta resolución:

- Resolución mínima de 2624x4000 píxeles
- Adquisición de hasta 8 cuadros/segundo
- Integración de cuadros
- Obtención de imágenes con hasta 16 bits de rango dinámico
- Enfriamiento por Peltier
- Obturador electrónico
- Exposición ajustable de 10 ms a 10s

#### Accesorio criogénico PolarPrep 2000 de Quorum Technologies

- Platina enfriada con nitrógeno líquido.
- Dispositivo de anticontaminación

- Cámara de preparación con platina enfriada y dewar
- Iluminación de la cámara de trabajo
- Cabezal de recubrimiento metálico con tarjeta de oro
- Cabezal de evaporación de fibra de carbón.
- Unidad de control para regulación de vacío, recubrimiento y temperatura



**Fig.14. Accesorio criogénico. Fuente: SAIT UPCT.**

#### Sistema de metalización SC7610 de Quorum Technologies

- Anillos para metalizar con oro
- Tamaño de grano inferior a 5nm
- Incremento de la temperatura inferior a 10°C.
- Uniformidad en el recubrimiento mejor del 10%

#### Sombreador de Carbono CA7615 de Quorum Technologies

- Evaporación mediante varilla de grafito
- De uso en la preparación de muestras para microanálisis

#### Desecador por punto crítico CPD 030 de BAL-TEC

- Hasta 9 posiciones de procesado.

- Velocidad de enfriamiento de 2°C/min

#### Aplicación para el análisis de imagen Image-Pro Plus de Media Cybernetics

- Mide longitudes, redondez, aspecto, ángulos, áreas, perímetros y huecos.
- Exporta las medidas a hojas de cálculo y paquetes estadísticos.

#### **3.3.1.3. Aplicaciones.**

Las aplicaciones de la técnica son muy numerosas, casi infinitas, aunque podemos destacar las siguientes:

- Ciencia de los materiales
- Ciencias biomédicas
- Botánica.
- Inmunología
- Hematología.

#### **3.3.1.4. Requisitos de las muestras.**

- Las muestras deben estar secas, exentas de líquidos y humedad a excepción de si vamos a utilizar la unidad de criogenización.
- Las muestras deben ser conductoras, si no lo son, se procederá a someterlas al tratamiento adecuado.
- El tamaño máximo de la muestra debe de ser de 1cm de altura.

### **3.3.2. Espectroscopía de dispersión de rayos x.**

Los rayos x son radiaciones electromagnéticas que se caracterizan porque su longitud de onda es del orden de  $10^{-10}$  m.

La espectroscopia de dispersión de Rayos X está basada en las interferencias ópticas que se producen cuando una radiación monocromática atraviesa una rendija de espesor comparable a la longitud de onda de la radiación. Los Rayos X tienen longitudes de onda de Angstroms, del mismo orden que las distancias interatómicas de los distintos componentes de las redes cristalinas.

Los Rayos X, al ser irradiados sobre la muestra se difractan con ángulos que dependen de la distancias interatómica de los compuestos que forman parte de la muestra.

El método analítico del Polvo, establece la fuente de r-x y el detector a igual distancia y ángulo de la superficie de la muestra. El ángulo  $2\theta$  se varía de forma continua.

La muestra es pulverizada y está conformada por multitud de cristales colocados al azar en todas las direcciones posibles. Si la orientación no es al azar se produce el fenómeno conocido como orientación preferente y altera de forma significativa las intensidades medidas.

En estas condiciones es cuando podemos irradiarla con rayos x y aplicar la Ley de Bragg:  $n\lambda = 2d \cdot \sin\theta$ , en la que “d” es la distancia entre los planos interatómicos que producen la difracción. A través de esta distancia vamos a poder determinar la composición química de la muestra.

#### **3.3.2.1. Equipamiento.**

##### Analizador por energías dispersivas de rayos X de Bruker AXS Microanalysis:

- Resolución de 128 eV en el pico  $K\alpha$  del Mn a la mitad de su altura.
- Área activa de 10 mm<sup>2</sup>.
- Aplicación informática Quantaz 200, capaz de manejar espectros de energías dispersivas de rayos x, perfiles de distribución de elementos a

lo largo de una línea y mapas de distribución de elementos en un área seleccionada.

### **3.3.2.2. Aplicaciones.**

- Identificación de fases. Una fase cristalina siempre produce un patrón de difracción característico, aun siendo un constituyente de una mezcla. El análisis cuantitativo se realiza mediante la identificación y caracterización de esta patrón utilizando para ello la base de datos Power Diffraction File.
- Pureza de muestras.
- Medida de tensiones.
- Análisis cuantitativo.
- Determinación de diagramas de fase.
- Determinación de estructuras cristalinas.
- Estudio de texturas.

### **3.3.2.3. Mastersizer 2000.**

La difracción láser se basa en el principio de que las partículas grandes dispersan la luz a ángulos bajos y las partículas pequeñas dispersan la luz a ángulos altos.

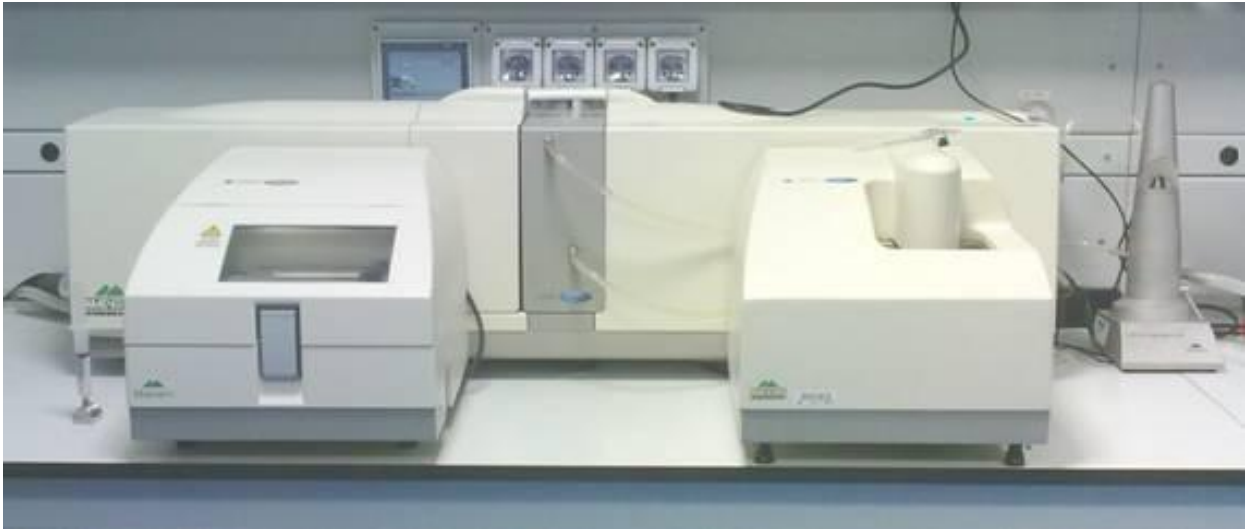
Los diferentes instrumentos miden la energía de la luz dispersada sobre un rango de ángulos y transforma dicha información en distribuciones de partícula.

Es de vital importancia conocer las propiedades ópticas de la muestra, así como, utilizar modelos de dispersión óptimos. Este método es el más utilizado para determinar el tamaño de partícula, la textura, estudios granulométricos en seco y disperso en un fluido.

### 3.3.3.1. Equipamientos.

#### Analizador Master Sizer 2000LF De Malvern Instruments.

Este instrumento permite medir el tamaño de partícula en un rango de 0.02 a 2000  $\mu\text{m}$ .



**Fig.15. Master Sizer 2000LF de Malvern Instruments. Fuente: SAIT UPCT.**

Las principales características y componentes que alberga son:

#### Banco óptico:

- Láser de He-Ne combinado con una fuente de luz azul de estado sólido de baja.
- Compensación por la solución de Mie.
- Alineamiento automático de láser.
- 5 segundos de tiempo de análisis.

El ensayo en nuestras muestras se realizó con la unidad de dispersión Hydro 2000G para dispersión en agua. Cuenta con ultrasonidos, agitación y caudal controlados.

### **3.3.4. Espectroscopía infrarroja con transformada de Fourier**

#### Fundamento

La espectroscopía infrarroja con transformada de Fourier es un método muy óptimo para identificar compuestos orgánicos e inorgánicos puros debido a que las especies moleculares absorben radiación infrarroja, albergando espectros de absorción característicos, indicándonos el tipo de enlaces y grupos funcionales. De esta forma vamos a poder correlacionar el espectro de un sustancia conocida con el del analito a estudiar.

La energía de la radiación infrarroja excita las transiciones vibracionales y rotacionales, pero no es suficiente para excitar las transiciones electrónicas (Skoog *et al*, 2005). Los espectros de absorción infrarroja presentan bandas de absorción estrechas y poco espaciadas resultantes de las transiciones entre distintos niveles vibracionales.

Un espectro de absorción, contiene una gama muy numerosa de bandas bien definidas. Las bandas de absorción que nos ayudan a identificar los grupos funcionales de los compuestos se localizan entre 2.5  $\mu\text{m}$  y 8.5  $\mu\text{m}$ , donde las posiciones de las posiciones de los máximos de absorción se ven poco afectadas por la estructura de carbono.

En la figura 15 se enumeran algunas de las posiciones de los máximos de absorción característicos de algunos de los grupos funcionales más comunes

$\text{cm}^{-1}$	Enlace/Vibración/Gpo. Funcional
920	C-H stretch (fructosa)
990	C-OH stretch (glucosa)
1053	C-O-C stretch (enlace glucosídico)
1069	C-OH bend
1104	C-O-C stretch antisimétrico (anillo de glucosa)
1130	C-OH stretch/bend (fructosa)
1365	CH <sub>3</sub> bend simétrico (pectina)
1348	CH <sub>2</sub> bend wagging (sacarosa)
1323	C-OH bend, -COO- stretch (pectina)
1430	C-O-H, O-C-H bend (fructosa)
1460	CH <sub>2</sub> bend tijera (C <sub>6</sub> en glucosa)
1636	COO <sup>-</sup> stretch carboxilo (pectina), OH stretch (fructosa)
1640	C=O stretch ester/ ácido carboxílico (pectina)
1745	C=O stretch carboxilo no iónico
3565	OH libres stretch

**Fig.16. Principales picos característicos de absorción en infrarrojo. Fuente: Rosas and Fernández., (2012).**

### 3.3.4.1 Equipamiento.

Los espectrómetros de infrarrojo de transformada de Fourier (FTIR) tienen una alta sensibilidad, rapidez y resolución en comparación a los espectrómetros convencionales. Detectan y miden todas las longitudes de onda de forma simultánea. Se debe modular la señal de la fuente e irradiar la muestra, de esta manera obtendremos un interferograma.

A través de la operación matemática conocida como transformada de Fourier vamos a decodificar el interferograma. Actualmente estos cálculos se realizan de forma automática con software específico.

Para el análisis de nuestras muestras hemos utilizado el espectrofotómetro Thermo Nicolet 5700.

El sistema óptico utiliza el principio del interferómetro de Michelson de barrido continuo con conducción de espejo móvil mediante colchón neumático y dispone de una bancada óptica monobloque, construida con fundición de aleación de aluminio bajo presión, lo que le confiere una estabilidad



excepcional, característica imprescindible en un sistema IRTF de altas prestaciones.

Cuenta con las siguientes características:

- Interferómetro tipo Michelson de geometría en  $45^\circ$ , de colchón de aire generado por el propio mecanismo interferométrico, de modo que no necesita fuente externa de gas para trabajar.
- Alineamiento automático y autoalineamiento dinámico continuo asistido por láser.
- Resolución mejor de  $0,5 \text{ cm}^{-1}$
- Velocidad de barrido del espejo móvil comprendida entre  $0,158$  y  $5,06 \text{ cm/s}$ .
- Precisión en longitud de onda mejor de  $0,01 \text{ cm}^{-1}$  para cada punto de dato, medida a  $2000 \text{ cm}^{-1}$  y controlada por el láser.
- Precisión en ordenadas mejor del  $0,07 \%$  de desviación, medida a  $4 \text{ cm}^{-1}$  con lámina de poliestireno de  $8 \mu\text{m}$ .
- Divisor de haz de Ge/KBr, con un intervalo espectral de  $7400$  a  $350 \text{ cm}^{-1}$ .
- Detector DTGS/KBr, con un intervalo espectral de  $12500$  a  $350 \text{ cm}^{-1}$ .
- Fuente infrarroja cerámica, operando a  $1525 \text{ K}$ , con un intervalo espectral de  $9600$  a  $15 \text{ cm}^{-1}$ .
- Láser de referencia de helio-neón, operando a  $15798 \text{ cm}^{-1}$ , prealineado y de alta capacidad.
- Generador de gas de purga, para eliminar la contribución espectral ambiental.
- Programa «Omnic», para la evaluación y manipulación de espectros.
- Accesorio «Smart Orbit», para el análisis por reflexión total atenuada de sólidos y líquidos.

- Accesorio de acoplamiento al analizador termogravimétrico, para el análisis de los gases desprendidos por la muestra en el horno.



**Fig.17. Espectrofotómetro de absorción infrarroja. Fuente: SAIT UPCT.**

#### **3.3.4.2. Aplicaciones.**

La espectrometría infrarroja es una de las técnicas más versátiles pero podemos destacar las siguientes aplicaciones:

- Caracterización e identificación de materiales (polímeros, plásticos, catalizadores, minerales etc).
- Análisis de productos farmacéuticos y de síntesis.
- Ciencia forense (identificación).
- Biomedicina (análisis de tejidos).
- Conservación artística (análisis de pigmentos y materiales).
- Seguimiento de procesos químicos.

### **3.3.5. Microtox®. Introducción.**

El método Microtox® es un bioensayo destinado a determinar la toxicidad de ciertos elementos o compuestos utilizando para ello la bioluminiscencia de la bacteria *Vibrio fischeri*, denominada previamente como *Photobacterium phosphoreum*. Fue diseñado por Azur Environmental y podemos encontrarlo perfectamente descrito en la bibliografía.

Este método se caracteriza por ser analítico rápido, barato, y fiable en contraposición de otros ensayos de toxicidad que utilizan otras especies de organismos como pueden ser: peces (truchas y gripis), microcrustáceos (*Daphnia*, *Artemia* y *Gammarus*), Algas (*Chlorella*, *Selenastrum*), que encarecen el coste, dificultan el desarrollo del ensayo o necesitan instalaciones específicas y personal muy cualificado. Es por ello, por lo que los investigadores prefieren utilizar este método frente a los anteriores para determinar la toxicidad de aguas (superficiales, subterráneas, residuales...) y lixiviados de muestras sólidas.

Además este ensayo, junto con el de *Daphnia*, está homologado en España para la caracterización de residuos tóxicos y peligrosos (BOE 1989).

#### **3.3.5.1. *Vibrio fischeri*.**

*Vibrio fischeri*, es una bacteria gran negativa, anaerobia facultativa, de la familia Vibrionaceae, cuya característica más representativa es la bioluminiscencia. Es importante reseñar que presenta estabilidad en la emisión de luz, así como, una gran sensibilidad a la mayoría de compuestos tóxicos. Es por ello, que a pesar de que existen varias bacterias luminiscentes ha sido esta especie la más óptima para desarrollar y aplicar estudios de toxicidad y contaminación.

La cepa utilizada es la nombrada como NRRL B-11177. Una de las razones para elegir esta cepa es que nunca se ha manifestado como agente patógeno. La Asociación Profesional de la Industria Química alemana, en su hoja informativa B006 1/92 ZH 1/346, ha clasificado a la bacteria dentro el grupo de riesgo 1, es decir, como no peligrosa para las personas y animales vertebrados.

### 3.3.5.2. Concepto de toxicidad, tipos y medidas de la misma.

Para entender el ensayo debemos conocer o definir el concepto de toxicidad, que se puede describir como la capacidad o potencial intrínseco de una sustancia para causar efectos negativos en organismos vivos, pudiendo ser estos efectos letales o sub-letales (Sprague and Mcleay, 1992).

Los efectos de la toxicidad se pueden clasificar en agudos o crónicos dependiendo de cómo de rápido se manifieste la respuesta del organismo. En la siguiente tabla podemos observar una clasificación sencilla de los mismos.

Toxic Effects		
1. acute		
2. chronic	2.1 biochemical and physiological	
	2.2 genotoxic	2.21 carcinogenic
		2.22 mutagenic

Fig.18. Clasificación de los efectos tóxicos. Fuente: Weyer, (1995).

Los efectos agudos se van a producir en un periodo corto de tiempo, que generalmente no supera el 10% de la vida del organismo testado, mientras que los efectos crónicos se van a manifestar en periodos de tiempo largo (Weyer, 1995).

Por tanto, el microtox, en nuestro proyecto de investigación, va a determinar y cuantificar los efectos agudos que van a producir los lixiviados obtenidos de las distintas clases de microplásticos extraídos.

La evaluación de la toxicidad va a estar determinada por las correlaciones entre las distintas dosis de los microplásticos y el efecto adverso que produzcan sobre la bacteria. Para medir este efecto, se emplea comúnmente las siguientes medidas:

- EC<sub>50</sub>: concentración de la sustancia que produce la inactivación del 50% de los organismos.
- LC<sub>50</sub>: concentración de la sustancia que produce la muerte del 50% de los organismos.

Según el valor de EC<sub>50</sub> obtenido, las muestras podrán clasificarse como (Directiva 93/67/EEC):

- Muy tóxicas para organismos acuáticos → EC<sub>50</sub> ≤ 1 mg/L
- Tóxicas para organismos acuáticos → 1 mg/L < EC<sub>50</sub> ≤ 10 mg/L
- Dañinas para organismos acuáticos → 10 mg/L < EC<sub>50</sub> ≤ 100 mg/L
- No dañinas para organismos acuáticos → EC<sub>50</sub> > 100 mg/L

### 3.3.5.3. Fundamento del método.

La luminiscencia de la bacteria se produce principalmente debido a la existencia de un complejo enzimático compuesto por NAD (P)H:FMN, oxidoreductasa y luciferasa (Xioyan *et al.*, 2014).

Primero, FMN se reduce a FMNH<sub>2</sub> a través de la enzima oxidoreductasa NAD(P)H:FMN. Después la luciferasa bacteriana produce FMN e presencia de una larga cadena de aldehído (RCHO) y oxígeno (Inouye, 1994), tal y como podemos ver en la siguiente figura:

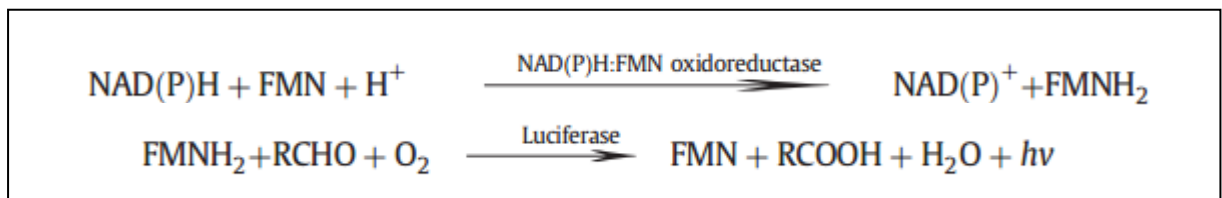


Fig.19. Ecuaciones del proceso de luminiscencia. Fuente: Xioyan *et al.*, (2014).

La emisión de luz está estrechamente relacionada con el metabolismo celular, ya que, la intensidad refleja el estado metabólico de la bacteria. Cuando la bacteria es expuesta a sustancias contaminantes, la luciferasa puede inhibirse o reducir la intensidad de luz emitida rápidamente (Xioyan *et al.*, 2014).

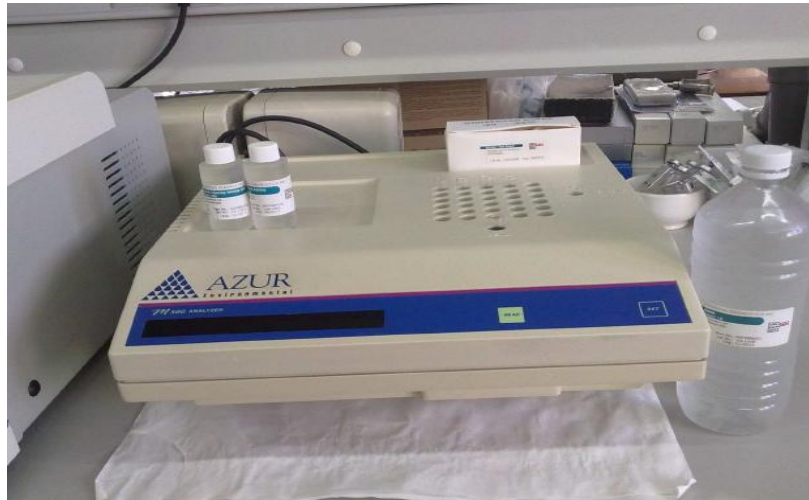
La toxicidad del compuesto se puede cuantificar comparando la luminiscencia que alberga una muestra control con las muestras sometidas a diferentes concentraciones del elemento a analizar.

Generalmente este método se ha utilizado para cuantificar la toxicidad de aguas residuales, aunque también se puede aplicar a muestras sólidas. Para ello, es necesaria la transferencia de los contaminantes desde la fase sólida a la fase líquida. Utilizaremos diferentes disolventes para extraer los tóxicos tanto orgánicos e inorgánicos, que serán analizados de forma independiente. El ensayo sobre las fases sólidas, fue desarrollado por Azur Environmental y es denominado Microtox® Solid Phase Test (SPT).

#### **3.3.5.4. Realización del bioensayo**

*Materiales:*

- Sistema Microtox® modelo 500. .
- Pc con software específico acoplado al microtox.
- Bacteria liofilizada.
- Solución diluyente (NaCl 2%).
- Solución de ajuste osmótico (NaCl 22%).
- Solución de reconstitución (agua ionizada).
- Lixiviados procedentes de los microplásticos extraídos.
- Viales de ensayo.
- Micropipetas.



**Fig.20. Sistema Microtox® Modelo 500.**

*Obtención y mantenimiento de la bacteria:*

La bacteria *Vibrio fischeri* en estado liofilizado se obtuvo de una empresa distribuidora de la misma en el estado español. Además, es de vital importancia establecer un protocolo de manejo y conservación de la bacteria, puesto que, un uso incorrecto de la misma puede influir sensiblemente en los resultados del ensayo. Por ello, la bacteria debe mantenerse en el congelador para evitar la degradación de la misma.

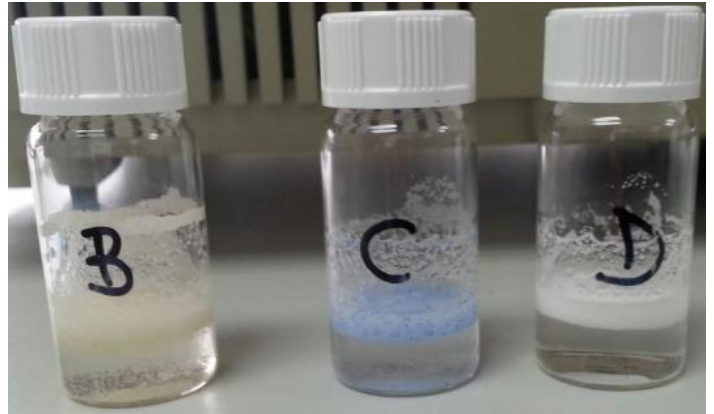
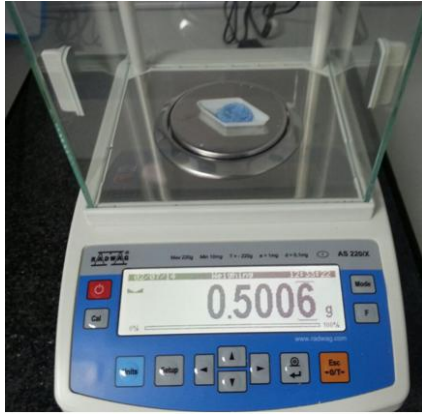
*Activación de la bacteria liofilizada:*

En primer lugar, se procede a la reconstitución de las bacterias, que se encuentran liofilizadas y congeladas. Para ello, se añade 1 ml de solución reconstituyente al propio vial de las bacterias. Tras homogeneizar el contenido, se trasvasa a un vial de ensayo y se sitúa en el pocillo correspondiente a bacterias reconstituidas, hasta que se alcance la temperatura de 15 °C (esperamos entre 20 y 30 minutos).

*Elaboración de la muestra:*

1. Obtención de los lixiviados. En una balanza de precisión pesamos 0.5g de los microplásticos obtenidos de cada muestra y los suspendemos en 5 ml de diluyente. A continuación los agitamos a 400 rpm durante 10 minutos, para favorecer la traslación de los contaminantes de los

microplásticos hasta la solución diluyente. Finalmente tamizamos la solución, utilizando para ello un filtro con una luz de malla de  $0.45\ \mu\text{m}$ . De esta manera obtenemos el inóculo a introducir en el ensayo microtox®



**Fig.21. Preparación de la muestra (pesada y suspensión).**



**Fig.22. Preparación de la muestra (Agitación).**



**Fig.23. Preparación de la muestra (filtrado).**





Fig.24. Lixiviados y blanco.

2. Preparación de las muestras:

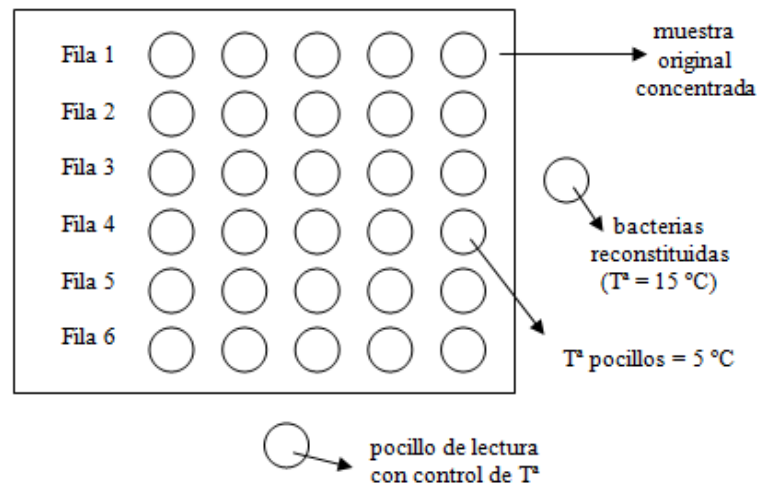
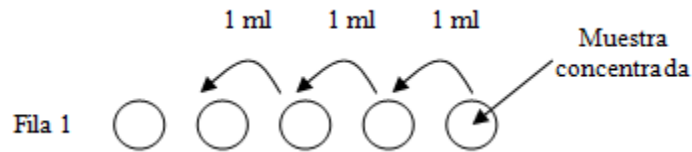


Fig.25. Esquema analizador de toxicidad.

La Fila 1 se reserva para la muestra original concentrada, de la que queremos evaluar su toxicidad. Para ello, en el primer pocillo de la parte superior derecha colocamos un vial con 2,5 ml de la muestra problema y 0,25 ml de la solución de ajuste osmótico (OAS: *Osmotic Adjusting Solution*), debido a que *Vibrio fischeri* es una bacteria marina, que necesita de una presión osmótica adecuada para mantenerse viva.

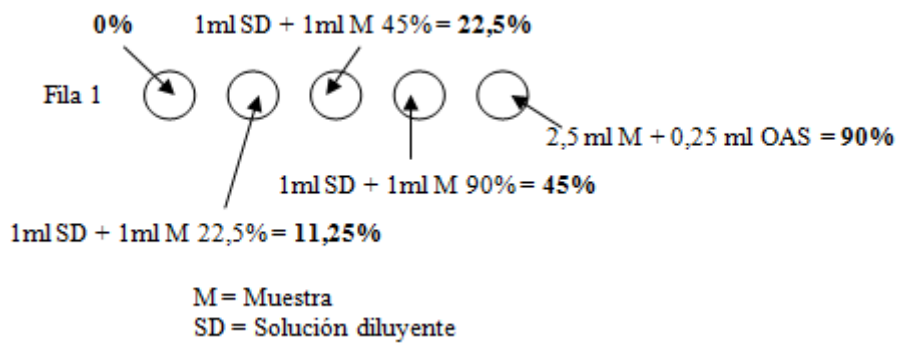
En el resto de los pocillos de la primera fila colocaremos 1 ml de la *solución diluyente*, y en los viales de la Fila 2 pondremos 0,5 ml de la misma solución diluyente.

A continuación, realizaremos diluciones seriadas de la muestra, tomando 1 ml del pocillo superior derecho y pasándolo al inmediatamente siguiente a su izquierda; tomando a continuación 1 ml de este último pocillo y pasándolo al siguiente a su izquierda, y así hasta el penúltimo vial de la primera fila. En el último no añadiremos nada, pues nos servirá de control.



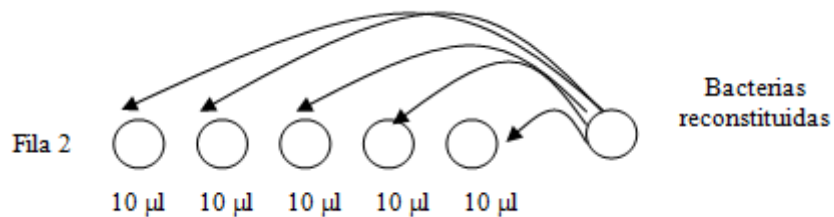
**Fig.26. Esquema de las diluciones.**

Por tanto, tenemos los siguientes porcentajes de dilución de la muestra:



**Fig.27. Porcentaje de dilución de cada muestra original.**

A continuación, se toman 10 µl del vial donde están las bacterias reconstituidas y los añadimos al primer vial ubicado en la fila 2. Se repite esta operación hasta que cada uno de los viales de esta fila contenga 10 µl del reactivo. Después, se espera entre 10 y 15 minutos para efectuar las lecturas.



**Fig.28. Bacterias reconstituidas**

## Parámetros.

Para conseguir realizar el ensayo de forma correcta, es necesario cumplir con una serie de condiciones y parámetros que quedan definidos en la siguiente figura:

Facilities and equipment	Photometer (Microtox® Model 500 Analyzer) reading light output at $490 \pm 100$ nm; incubator for single cuvette at $5.5 \pm 1^\circ\text{C}$ ; controlled-temperature room or incubator at $15 \pm 0.5^\circ\text{C}$
Reconstitution solution	Pure, nontoxic water
Control/dilution water	Diluent purchased from the same commercial supplier or 3.5% NaCl solution
Test temperature	$15 \pm 0.5^\circ\text{C}$
Sample pH, salinity and color/turbidity	No adjustment or correction
Aeration	None required
Subsamples for moisture content	Three replicates of $5 \pm 0.2$ g dried at $100 \pm 0.5^\circ\text{C}$ for 24 h
Primary dilution	$7.00 \pm 0.05$ g whole, homogenized sediment in 35 mL dilution water in a beaker, mixed for 10 min on a magnetic stirrer, at a rate such that the vortex depth is half the height of the liquid level
Test concentrations	Maximum test concentrations normally $197,000 \text{ mg L}^{-1}$ (19.7%, wet wt:vol) on wet-weight basis with two-fold dilutions, for a total of 12 test concentrations in disposable polystyrene tubes; four control solutions; left for 10 min to equilibrate to the test temperature
Test species	<i>Vibrio fischeri</i> strain NRRL B-11177, reconstituted by swirling vial three to four times, and mixed ten times with 0.5 mL pipette and held at $5.5 \pm 1^\circ\text{C}$ for 30 min
Inoculum	20 $\mu\text{L}$ into each test concentration, mixed three times with 1.5 mL pipette.
Incubation	20 min at test temperature, filter columns inserted into top of SPT tubes above surface of test concentrations
Filtrate transfer	500 $\mu\text{L}$ into disposable glass cuvettes at test temperature
Observations	Light levels of all test filtrates and controls measured
Endpoint	IC50 ( $\text{mg L}^{-1}$ ), calculated by software; normalized for moisture content of sediment
Reference toxicant	Performed within one month of each test, using suitable positive control sediment and the procedures and conditions for measuring the toxicity of test sediment

**Fig.29. Parámetros y condiciones a seguir para el desarrollo del SPT con la bacteria marina *Vibrio Fischeri*. Fuente: Casado et al (2006).**

Debemos comentar que hemos realizado algunas modificaciones en los parámetros anteriores, sin que estos signifiquen cambios o alteraciones significativas para el bioensayo.

## Lectura.

Transcurridos los 10-15 minutos, se procede a la lectura de cada uno de los viales de la Fila 2, que es donde se encuentra el reactivo (las bacterias). Valores similares entre los distintos viales es indicativo de que hemos realizado un buen pipeteo.

Para este proceso, tomaremos el vial del primer pocillo de la Fila 2 y lo introduciremos en la celda del fotomultiplicador. Pulsamos SET y después pulsamos READ para medir la emisión de luz de las bacterias contenidas en

este vial y anotamos el dato. Introducimos a continuación el segundo vial de la Fila 2 en la celda del fotomultiplicador y pulsamos READ, tomando también este dato. Haremos esto mismo con los viales tercero, cuarto y quinto de esta segunda fila. Todos estos valores se corresponden con el parámetro  $I_0$ , es decir, el valor máximo de emisión de la bacteria, que, como hemos comentado anteriormente, deberán ser muy parecidos.

A continuación, procedemos a trasvasar 0,5 ml de cada uno de los viales de la Fila 1 al inmediatamente inferior de la Fila 2, comenzando siempre por el más diluido hasta el más concentrado, es decir, de izquierda a derecha, con objeto de acumular un error mínimo. Después se esperan 10-15 minutos para que el posible tóxico contenido en nuestra muestra haga su efecto sobre la capacidad luminiscente del *Vibrio fischeri*.

Una vez transcurridos el tiempo, se procede a la lectura de cada uno de los viales de la Fila 2. Para ello, introduciremos, de uno en uno, los viales de esta fila en la celda del fotomultiplicador, pulsando cada vez READ. Cada uno de estos valores es un valor de emisión ( $I_{10}$  ó  $I_{15}$ ), es decir, de toxicidad a los 10 ó 15 minutos.

#### **Tratamiento de los datos:**

El programa calcula automáticamente el valor de la EC50 (al introducir el valor  $I_0$  e  $I_{10}$  ó  $I_{15}$ ). Es conveniente que este valor esté comprendido entre las concentraciones de las diluciones de nuestras muestras. Si este valor de EC<sub>50</sub> calculado no cae dentro de este entorno, se cometerá bastante error al ser calculado por extrapolación.

Pudiera ocurrir que todos los viales de la Fila 2 (excepto el del extremo izquierdo, que no contiene muestra) dieran valor 0. Esto indicaría que la sustancia es extremadamente tóxica (ni siquiera la muestra más diluida ha dejado bacterias con capacidad de emitir luz). En este caso habría que diluir la muestra de partida y repetir el análisis desde el principio.

En el caso de que todos los viales dieran un valor alto de lectura, indicaría que se trata de una sustancia poco tóxica. En este caso, podría esperarse otros 15 minutos y dar el valor de  $I_{30}$ .

### 3.3.5.5. Principales aplicaciones:

El ensayo microtox® tiene una gran aplicabilidad, sobre todo, en numerosos aspectos de la ingeniería ambiental, entre los que podemos destacar:

- Efluentes de aguas residuales.
- Evaluación de la toxicidad aguda.
- Ensayos de sedimentos lacustres y marino.
- Monitoreo y de aguas superficiales y/o de consumo para la identificación de contaminación.
- Monitoreo y seguimientos de suelos y substratos contaminados.

### 3.3.5.6. Interferencias

Existen diferentes situaciones o compuestos químicos que pueden alterar el ensayo microtox®, obteniendo unos resultados erróneos. Por ello, debemos considerar las siguientes limitaciones:

- Color. Si se tiene certeza o incluso sospecha de que existe interferencia por este aspecto, realizaremos la corrección de la lectura, de acuerdo a los procedimientos existentes.
- Turbidez. Si no existe mucha turbidez podemos dejar sedimentar y extraer el sobrenadante. En caso de que la muestra albergue demasiada turbidez, procederemos a centrifugarla y obtendremos de esta manera el sobrenadante.
- pH. Este tipo de bacterias se mantienen en condiciones óptimas, siempre que el pH se encuentre entre 6-8.5. Por ello, cualquier ensayo microtox que se realice fuera de este rango no será representativo.
- Muestras cloradas. *Vibrio fischeri*, al igual que la mayoría de bacterias presentes en el agua, son sensibles a la presencia de cloro. Si la muestra contiene este elemento, podemos neutralizarlo mediante la adicción de tiosulfato de sodio ( $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ ).
- Compuestos volátiles. Si la muestra contiene compuestos volátiles van a ir evaporándose a lo largo de la realización del bioensayo, por lo que nos va a alterar la estabilidad de la respuesta y en consecuencia el resultado obtenido, sobre todo, en ensayos con análisis replicados. En este

método la única opción factible, si se quiere conocer la toxicidad de la fracción volátil, es realizar el bioensayo durante una duración corta (5m) y en sistemas parcialmente cerrados y refrigerados.

### 3.3.5.7. Límites de vertido.

En nuestra Comunidad Autónoma, el Decreto 16/1999, de 22 de abril, sobre vertido de aguas residuales industriales al alcantarillado, establece en su Anexo III (valores máximos instantáneos de los parámetros de contaminación) un valor máximo de 25 Equitox/m<sup>3</sup>, unidad empleada para medir la toxicidad del agua.

Este valor está en sintonía, con otros límites de vertido fijados en otras comunidades autónomas, tal y como podemos apreciar en la siguiente tabla:

**Tabla.4. Límites de vertidos en diferentes localidades españolas.**

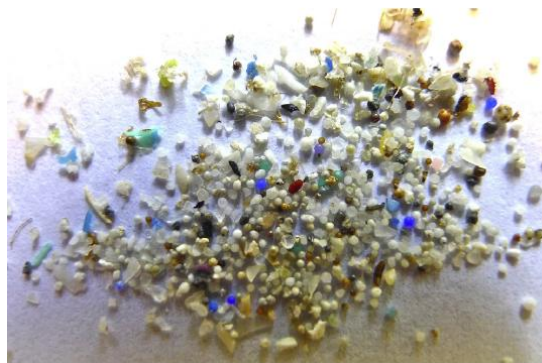
LOCALIDAD	VALOR DE ECOTOXICIDAD EN VERTIDOS
Madrid	(Ley 10/1993) → 25 Equitox/m <sup>3</sup>
Alicante	Ley municipal 286/2004 → 30 Equitox/m <sup>3</sup>
Islas Canarias	Ley municipal 98/2005 → 20 Equitox/m <sup>3</sup>
La Rioja	Ley 11/2006 → 25 Equitox/m <sup>3</sup>
Sevilla	Ley municipal 149/2008 → 15 Equitox/m <sup>3</sup>

#### 4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.

El análisis a simple vista de los microplásticos extraídos nos mostraba que:

- Los microplásticos son visibles a simple vista, sin necesidad de utilizar microscopía.
- Existen importantes variaciones de tamaño y morfología entre los microplásticos de una misma muestra.
- Los microplásticos pueden tener diferentes tonalidades que en muchos casos está relacionado con la composición química de los mismos.
- Las diferentes casas comerciales utilizan diferentes concentraciones y tipos de microplásticos.

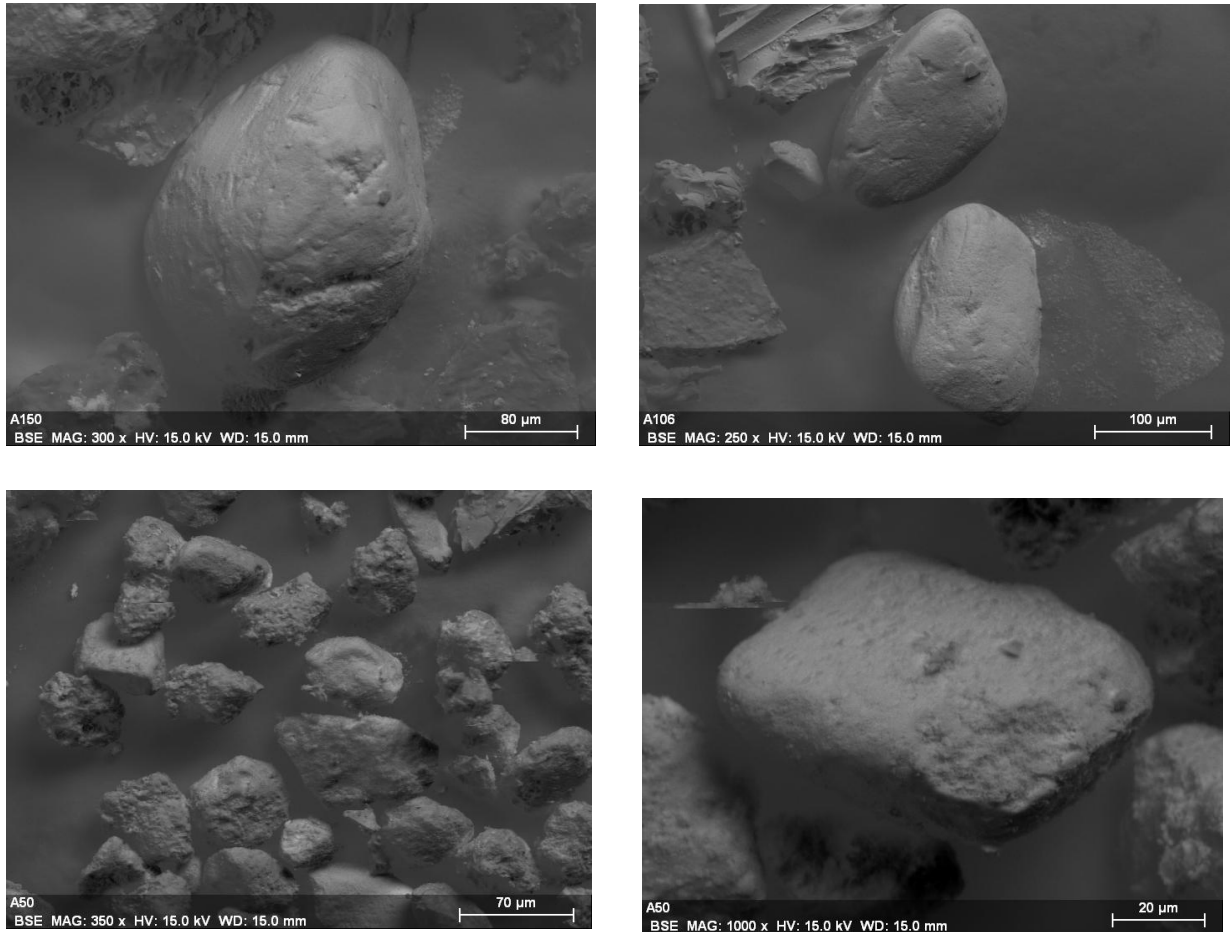
Estas evidencias han sido demostradas con anterioridad en otras muestras de cosméticos similares a las nuestras (Eriksen et al., 2013), tal y como podemos apreciar en la siguiente imagen.



**Fig.30. Variación de color y tamaño en microplásticos. Fuente: Eriksen et al., (2013).**

#### 4.1. SEM-EDX.

A continuación vamos a observar una serie de fotografías, de los microplásticos obtenidos de las distintas muestras:



**Fig.31. Fotografías de microplásticos obtenidos de la muestra A.**



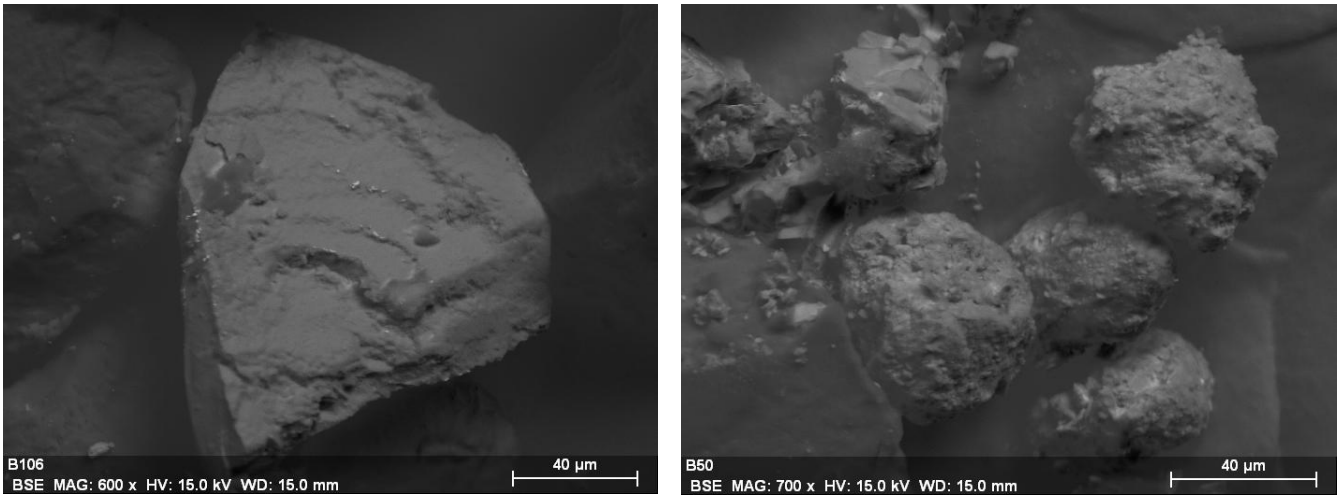


Fig.32. Fotografías de microplásticos obtenidos de la muestra B.

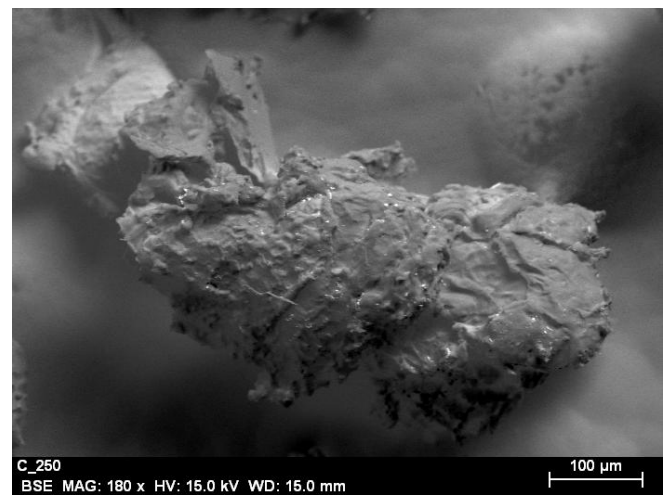
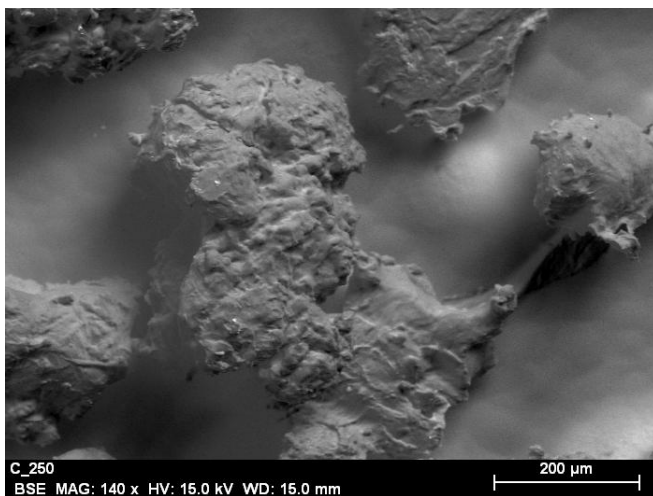
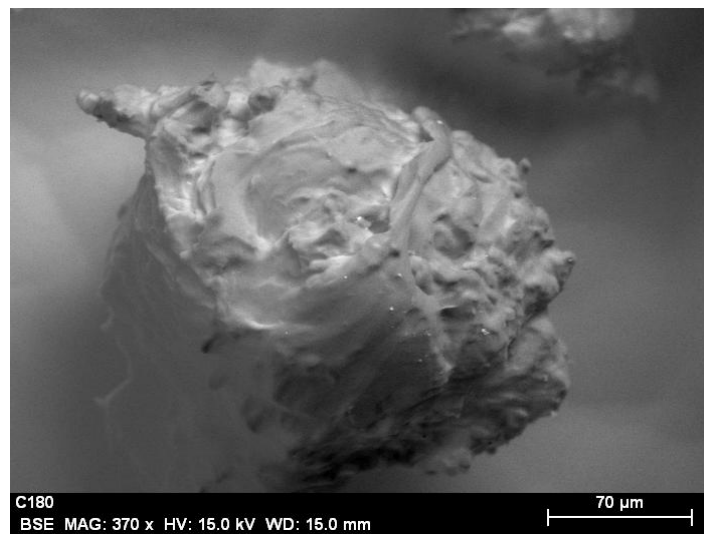
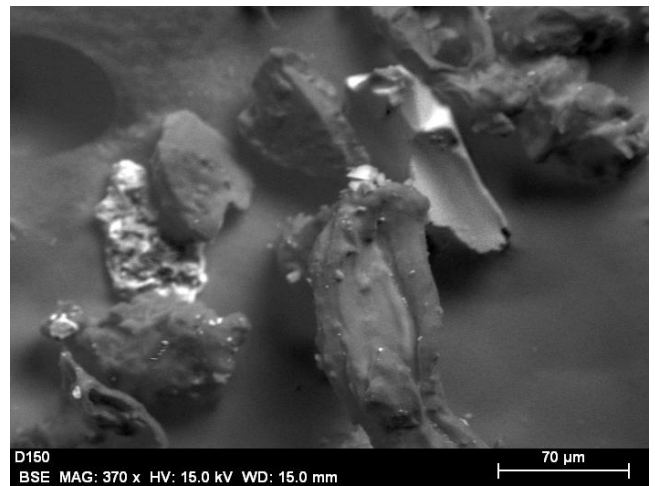
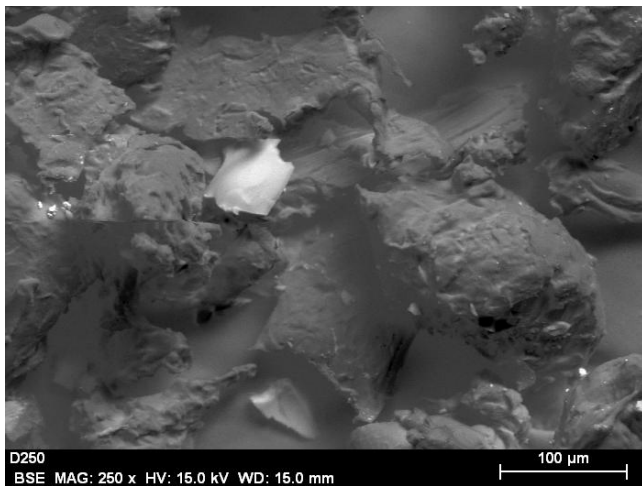
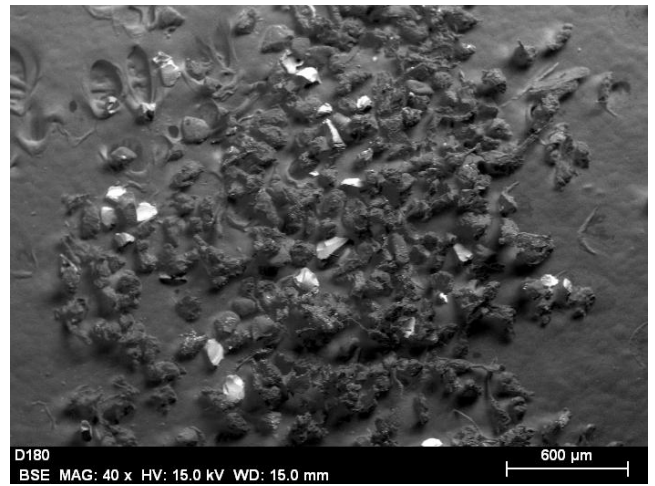
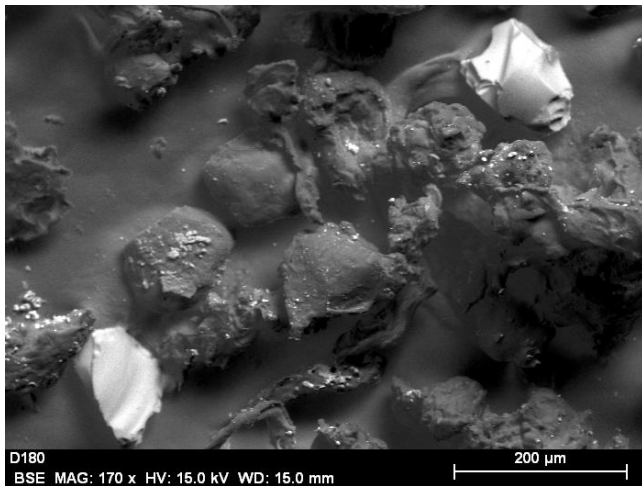


Fig. 33. Fotografías de microplásticos obtenidos de la muestra C.



**Fig.34. Fotografías de los microplásticos obtenidos de la muestra D.**

Como hemos podido observar en las fotografías anteriores, existe una gran variedad de microplásticos en cuanto a tamaño y formas. En todas las muestras han aparecidos microplásticos situados en el rango desde 50 μm

hasta 250  $\mu\text{m}$ . Además han apareciendo multitud de formas destacando las siguientes: ovaladas, elipses, redondeadas y algunas parcialmente deteriorados.

Por otro lado, debemos destacar que podemos apreciar los elementos traza que los acompañan en su formulación y composición química.

## 4.2. Dispersión de rayos x.

A continuación vamos a observar los diferentes difractogramas con la composición química de los microplásticos de cada muestra.

### Muestra A:

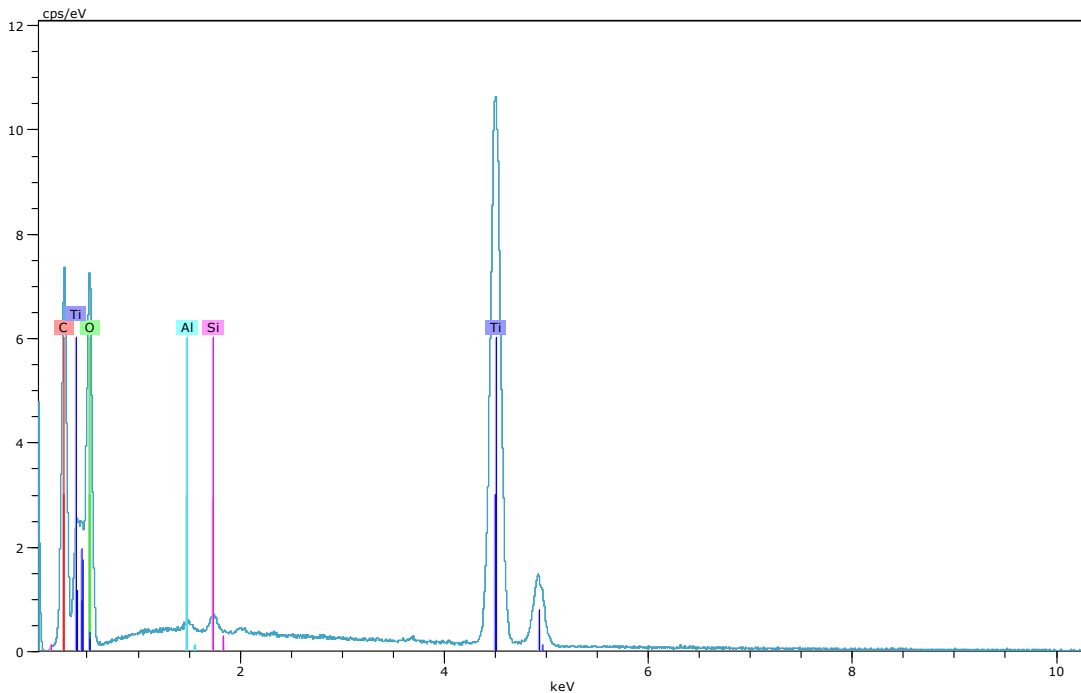
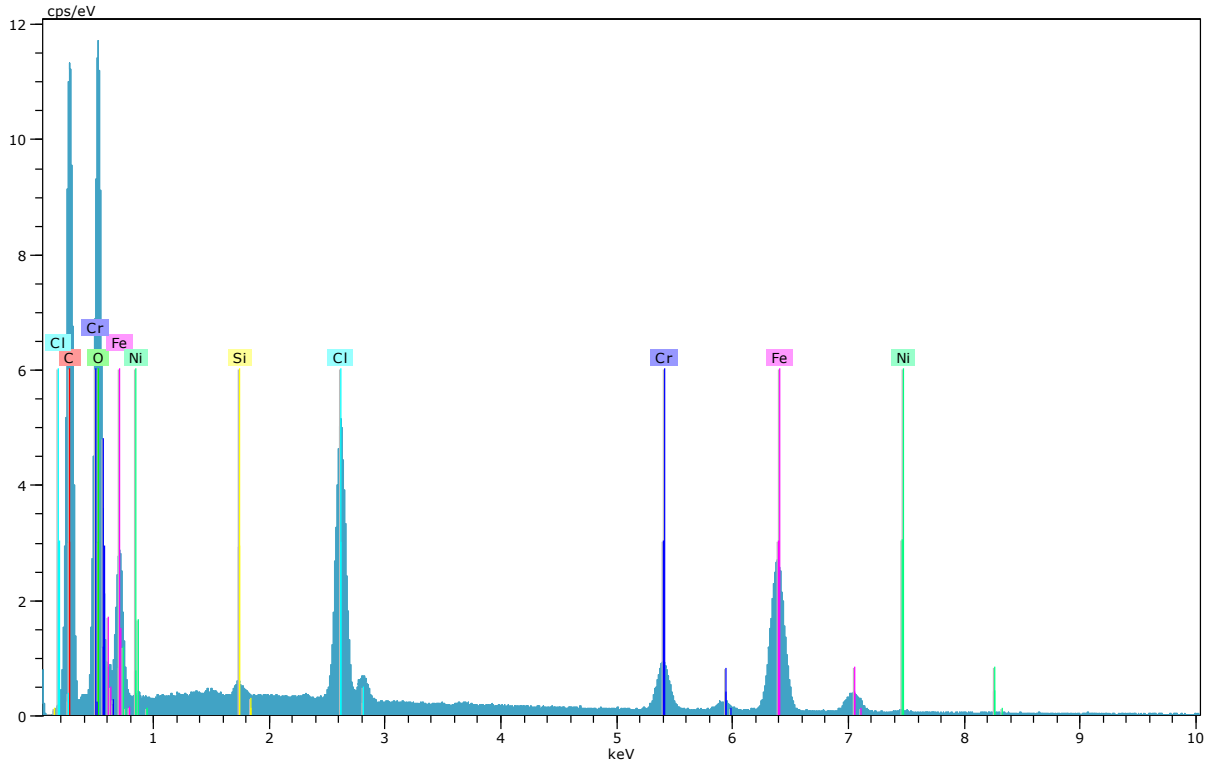


Fig. 35. Difractograma de la muestra A.

Tabla 5. Composición química de los microplásticos de la muestra A.

Spectrum: A150						
EI	AN	Series	Unn (%)	C. Norm (%)	C. Atom (%)	C. Error (%)
C	6	K-series	9,79	9,71	18,55	1,2
O	8	K-series	40,15	39,84	57,11	17,9
Al	13	K-series	0,18	0,18	0,15	0,00
Si	14	K-series	0,32	0,32	0,26	0,00
Ti	22	K-series	50,34	49,95	23,93	1,5
<b>Total</b>			100,79	100,00	100,00	

**Muestra B:**

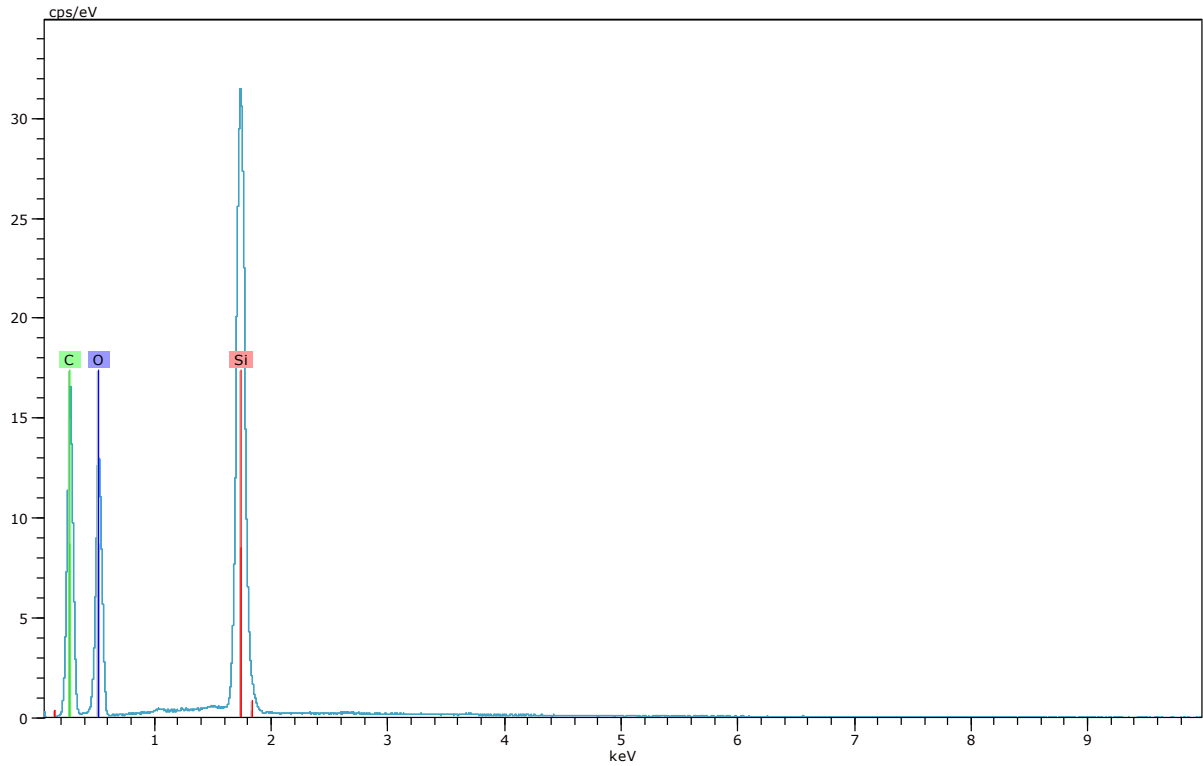


**Fig. 36. Difractograma de la muestra B.**

**Tabla 6. Composición química de los microplásticos de la muestra B.**

Spectrum:B75						
EI	AN	Series	Unn (%)	C. norm (%)	C. atom (%)	C. Error (%)
C	6	K-series	19,07	19,36	35,65	2,3
O	8	K-series	30,16	30,62	42,33	3,70
Si	14	K-series	0,22	0,23	0,18	0,00
Cl	17	K-series	8,57	8,7	5,43	0,30
Cr	24	K-series	5,74	5,82	2,48	0,20
Fe	26	K-series	33,37	33,88	13,42	1,00
Ni	28	K-series	1,36	1,39	0,52	0,10
<b>Total</b>			98,5	100,00	100,00	

**Muestra C:**

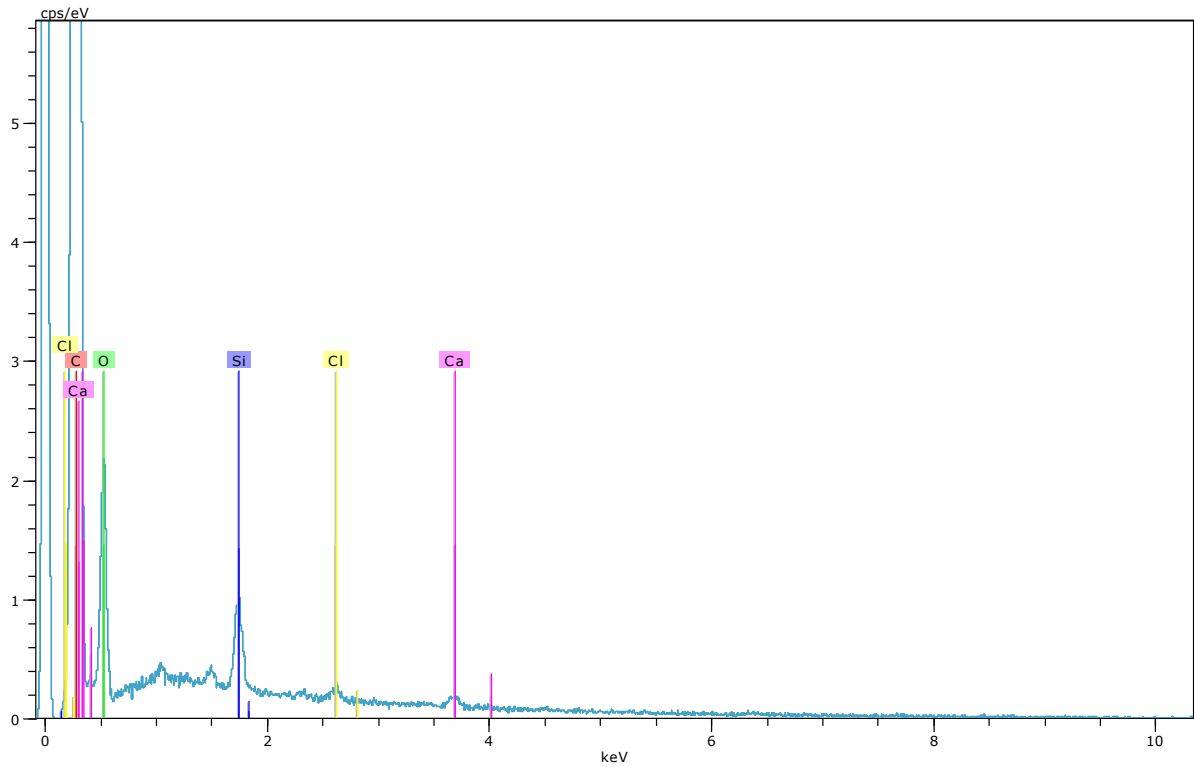


**Fig. 37. Difractograma de la muestra C.**

**Tabla 7. Composición química de los microplásticos de la muestra C.**

Spectrum: C150						
El	AN	Series	Unn (%)	C. norm (%)	C. atom (%)	C. Error (%)
C	6	K-series	30,06	26,81	36,95	3,4
O	8	K-series	50,1	44,69	46,24	5,80
Si	14	K-series	31,96	28,51	16,8	1,40
<b>Total</b>			112,12	100,00	100,00	

**Muestra D:**



**Fig. 38. Difractograma de la muestra D.**

**Tabla 8. Composición química de los microplásticos de la muestra D.**

Spectrum: D180						
EI	AN	Series	Unn (%)	C. Norm (%)	C. Atom (%)	C. Error (%)
C	6	K-series	75,93	75,93	81,09	23,4
O	8	K-series	23,06	23,06	18,48	7,40
Si	14	K-series	0,71	0,71	0,32	0,01
Cl	17	K-series	0,09	0,09	0,03	0,00
Ca	24	K-series	0,21	0,21	0,07	0,00
<b>Total</b>			100,00	100,00	100,00	

En la siguiente tabla, podemos observar una comparativa entre todas las muestras que hemos estudiado anteriormente.

**Tabla 9. Composición química de los microplásticos estudiados.**

Elementos (%)	Composición química de los distintos microplásticos extraídos de las muestras			
	A	B	C	D
C	9,71	19,36	26,81	75,93
O	40,15	30,62	44,69	23,06
Na	-	0,87	-	-
Al	0,18	1,64	-	-
Si	0,32	0,23	28,51	0,71
Ca	-	-	-	0,21
Fe	-	33,88	-	-
Ti	49,95	-	-	-
Cl	-	8,7	-	0,09
Cr	-	5,82	-	-
Ni	-	1,39	-	-

Como podemos observar en la tabla anterior, todas las cremas contienen sílice en su composición, en mayor o menor medida, siendo la muestra C la que mayor contenido tiene (28.51%). El origen de esta sílice es difícil de determinar aunque de forma general suele ser incluida a través de las siguientes formas:

1. A través de diferentes silicatos: silicato de aluminio hidratado (caolín), silicato de magnesio hidratado (talco), silicato de sodio (vidrio soluble) y silicato de hierro. Entre sus principales características podemos destacar que: incrementan la viscosidad, aumentan resistencia mecánica, elevan el punto de fusión etc. Además el talco es muy utilizado en cosméticos para eliminar grasas y suciedad. Es muy probable que este tipo de compuestos hayan sido utilizados en la muestra B y por ello encontramos trazas de Na, Fe y otros compuestos metálicos. Otra opción es que estos elementos provengan de distintos derivados del

EDTA, tales como: etilen-diamino-tetraacetato de calcio y disodio. Estas sales se utilizan de forma general como antioxidantes capturando trazas de iones metálicos y otros elementos que facilitan las reacciones de oxidación. La muestras A y D también contendría estos silicatos pero en menor proporción.

2. A través de óxidos de sílice. Se le pueden adicionar trazas de cuarzo, ópalo, silex o diatomita. En este grupo estaría incluida la muestra C. Como podemos observar alberga un contenido elevado en silíceo y oxígeno, tratándose de un elemento diferenciador con las otras muestras. Que no aparezcan elementos traza en la composición de la muestras nos puede confirmar el origen de la sílice.

Debemos hacer especial hincapié en la elevada proporción de titanio que tiene la muestra A. Esta elevada concentración de titanio, conjuntamente con el elevado contenido en oxígeno, nos hace pensar, que se trata de dióxido de titanio. Este compuesto es muy utilizado en la producción de pinturas, plásticos, cosméticos, productos textiles etc. Se trata de un magnífico pigmento blanco que ha sido codificado como CI 77891 en cosmética y como E171 en la industria alimentaria. Tras observar la composición reflejada en la etiqueta de la misma, comprobamos que reflejan el uso de este compuesto en su composición inicial.



### 4.3. Mastersizer 2000.

El tamaño medio de los microplásticos de las muestras analizadas se encuentra entre 70 y 190  $\mu\text{m}$ . Estos tamaños medios son muchos más pequeños que los otorgados por Fendall and Sewell, 2009, en un estudio con muestras similares, cuyos tamaños se encuentran entre 196 y 375  $\mu\text{m}$ .

Si comparamos estos valores con estudios de microplásticos en las aguas superficiales (ya sean ríos u océanos), encontramos una gran variedad de resultados. Eriksen *et al.* (2013) en su estudio de microplásticos en aguas superficiales encontraron y caracterizaron microplásticos albergando estos un tamaño entre 355  $\mu\text{m}$  y 4,75 mm. En cambio, Cauwenberghe *et al.*, (2013), extrajeron microplásticos de los fondos marinos, con tamaños similares a los nuestros, entre 60 y 180  $\mu\text{m}$ . Este tamaño tan pequeño de nuestros microplásticos va a influir de forma determinante el efecto sobre los distintos organismos del medio acuático, los cuales, van a ingerir estas sustancias al confundirlos con micronutrientes (Moore, 2008). Muchos autores, tales como Setala *et al* (2014) o Browne *et al* (2008) han demostrado la ingesta de microplásticos con un tamaño alrededor de 10  $\mu\text{m}$ , por lo que pueden introducirse en la cadena trófica con cierta facilidad. La ingesta de microplásticos con tamaño <2000  $\mu\text{m}$  se ha observado en numerosas especies de organismos tales como: bivalvos, equinodermos, poliquetos, briozoos etc (Thompson *et al*, 2004 y Ward and Shumway, 2004).

En cuanto a la homogeneidad, la marca C fue la más semejante en tamaño con el 99,62% de las partículas distribuidas entre 10 y 250  $\mu\text{m}$  de tamaño, correspondiente al valor más bajo Span, es decir,  $0,975 \pm 0.050$ . Por el contrario, a pesar del 78,58% y el 80,97% de frecuencia de volumen de partículas para las marcas A y D, respectivamente, también variaron entre 10 y 250 micras, hubo una disparidad en la distribución de tamaño más amplia. La presencia de nanopartículas en ambas marcas los haría más propensos a ser ingeridos por los bivalvos que se alimentan por filtración y pequeños organismos planctónicos, como copépodos, que pasan a la acumulación y en

los niveles superiores de la cadena alimentaria (Fendall y Sewell, 2009). Curiosamente, el limpiador facial A fue uno de los más baratos (39,67 € / L) y la marca D el más caro (106,75 € / L).

Los microplásticos contenidos en los cuatro muestran una gran variedad de áreas superficiales con una media mínima de  $0.059 \text{ m}^2/\text{g} \pm 0.001 \text{ m}^2/\text{g}$  para el gel exfoliante C hasta una media máxima de  $4,7 \text{ m}^2/\text{g} \pm 2.151 \text{ m}^2/\text{g}$  para el gel limpiador A. Es evidente, que incluso para los valores más bajos, estas partículas pueden actuar como adsorbentes en el medio ambiente trasportando contaminantes orgánicos o metales pesados, en comparación con otros bioadsorbentes utilizados en otros ensayos (Bayo, 2012).

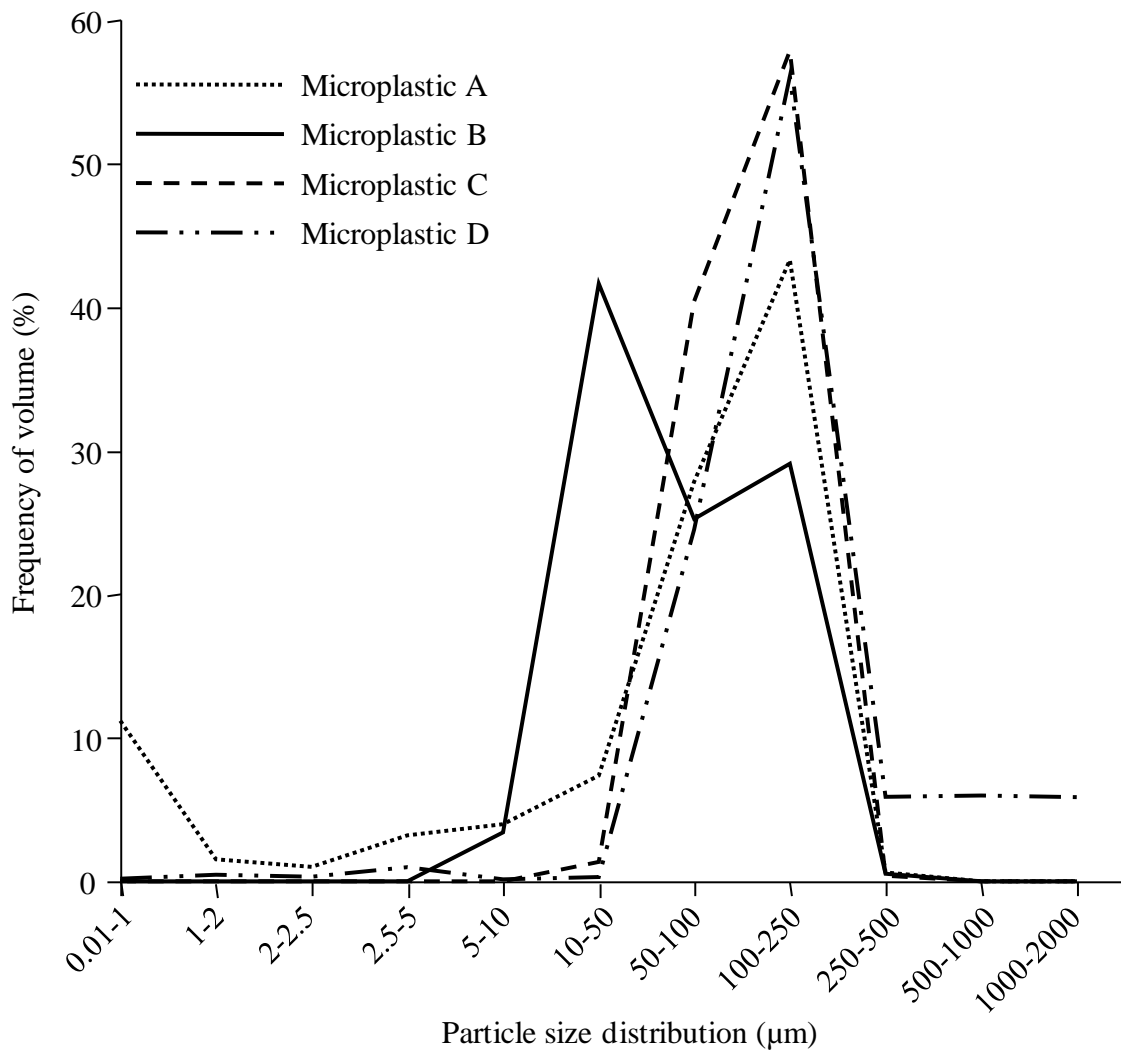


Fig. 39. Distribución del tamaño de partículas de las diferentes muestras analizadas

**Table 10**

Particle size and distribution (three samples were analysed for each microplastic, with three repetitions)

Samples	SSA (m <sup>2</sup> /g)	APD (µm)	Span
Microplastic A	4.776 ± 2.151	87.905 ± 11.418	1.916 ± 0.330
Microplastic B	0.178 ± 0.017	73.596 ± 6.761	2.464 ± 0.448
Microplastic C	0.059 ± 0.001	115.067 ± 3.003	0.975 ± 0.050
Microplastic D	0.183 ± 0.028	185.145 ± 80.123	1.931 ± 1.487

SSA (Specific Surface Area); APD (Average Particle Diameter)

#### 4.4. FTIR.

A continuación podemos observar los espectros de absorción de los distintos microplásticos y la determinación analítica de los mismos. Debemos destacar que la identificación de los grupos funcionales pocas veces es suficiente para determinar la composición del analito, por lo tanto, es necesario comparar el espectro de absorción completo con espectros de compuestos conocidos a través de una potente base de datos (Pretsch *et al*, 2000).

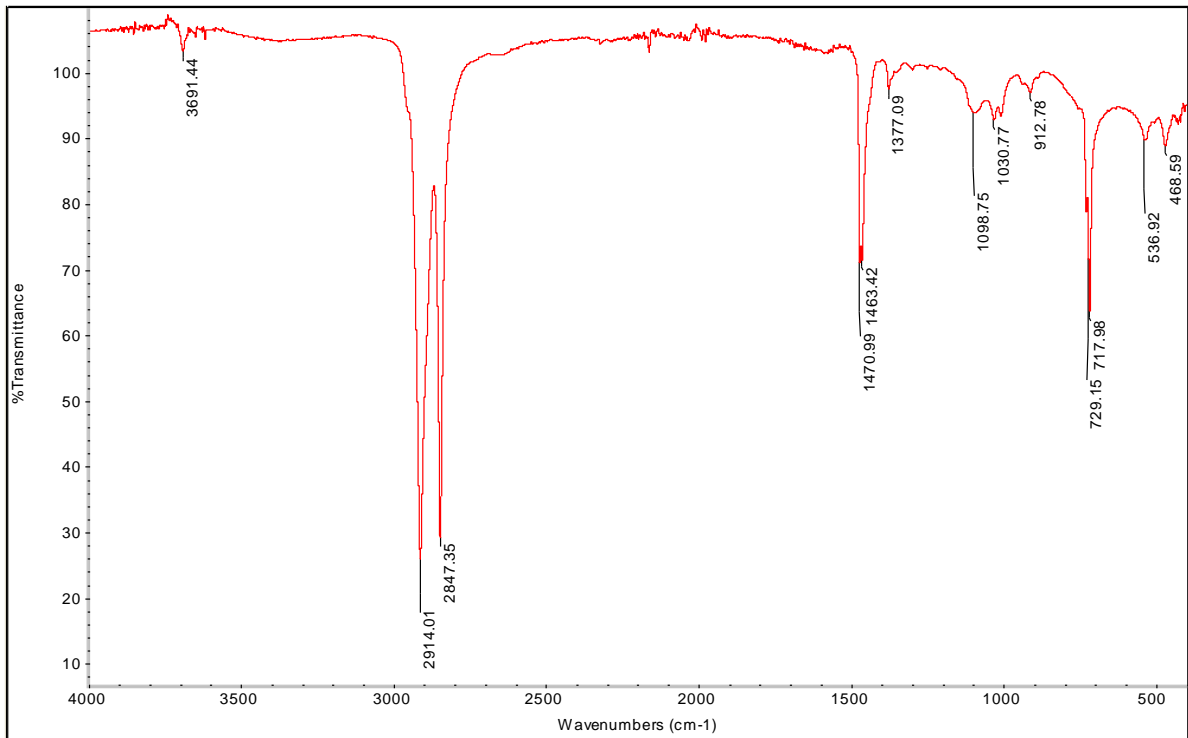


Fig. 40. Espectro de absorción de la muestra A.

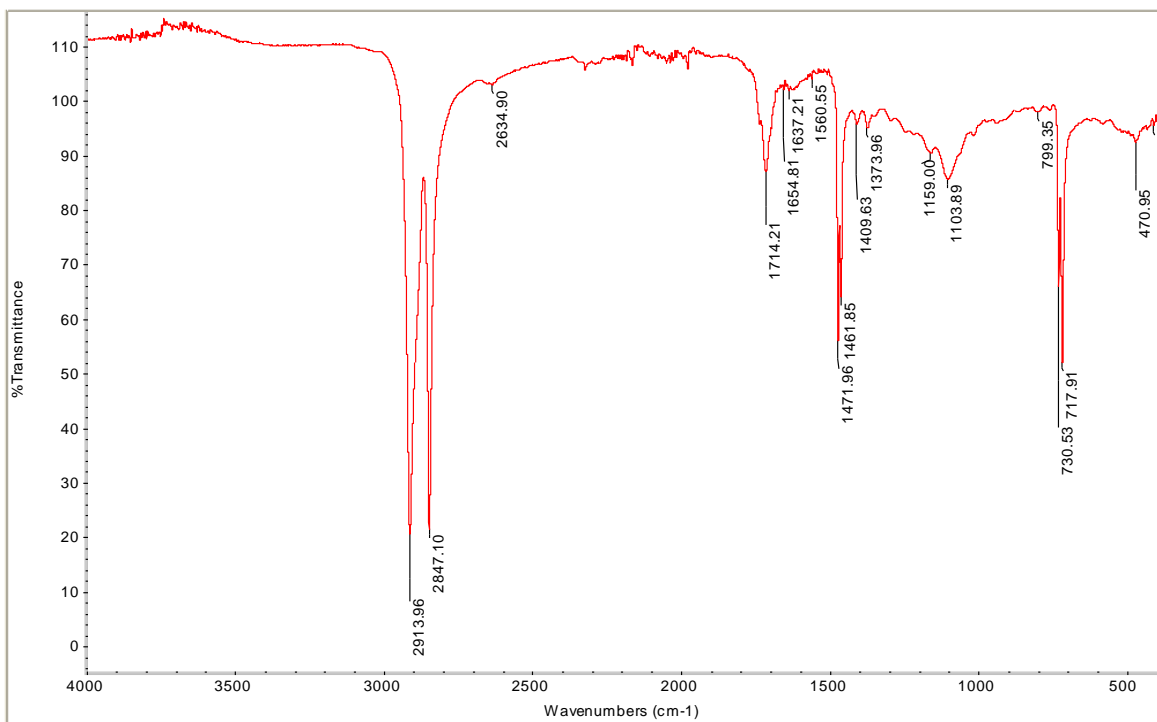
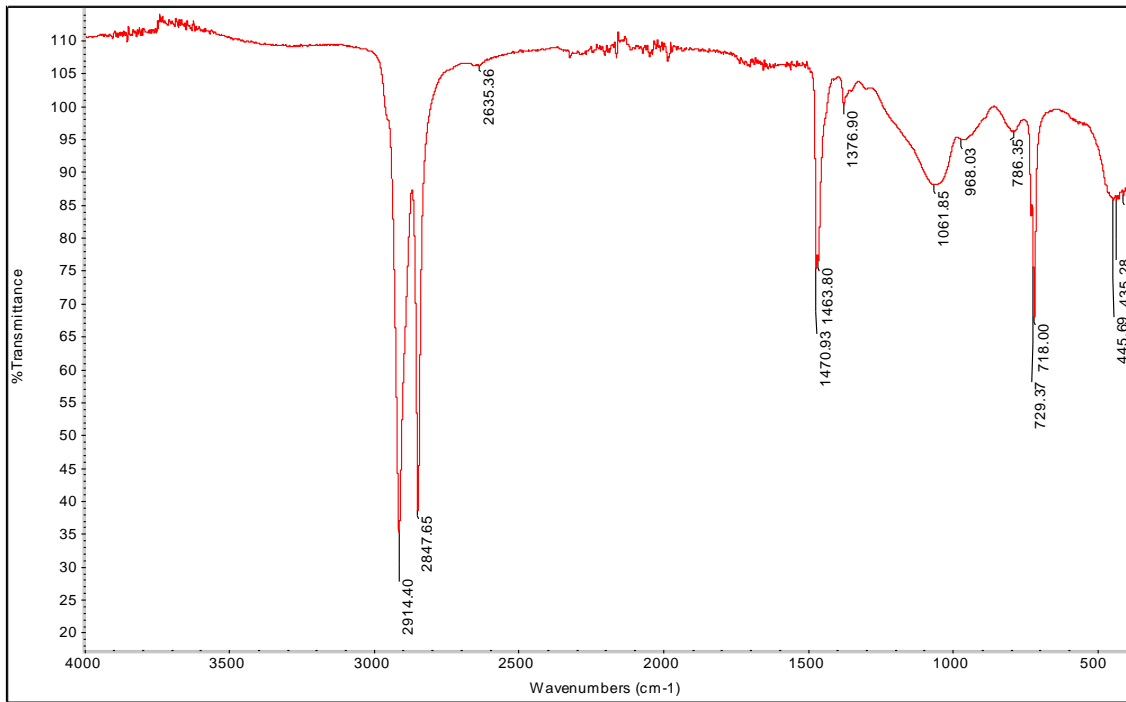
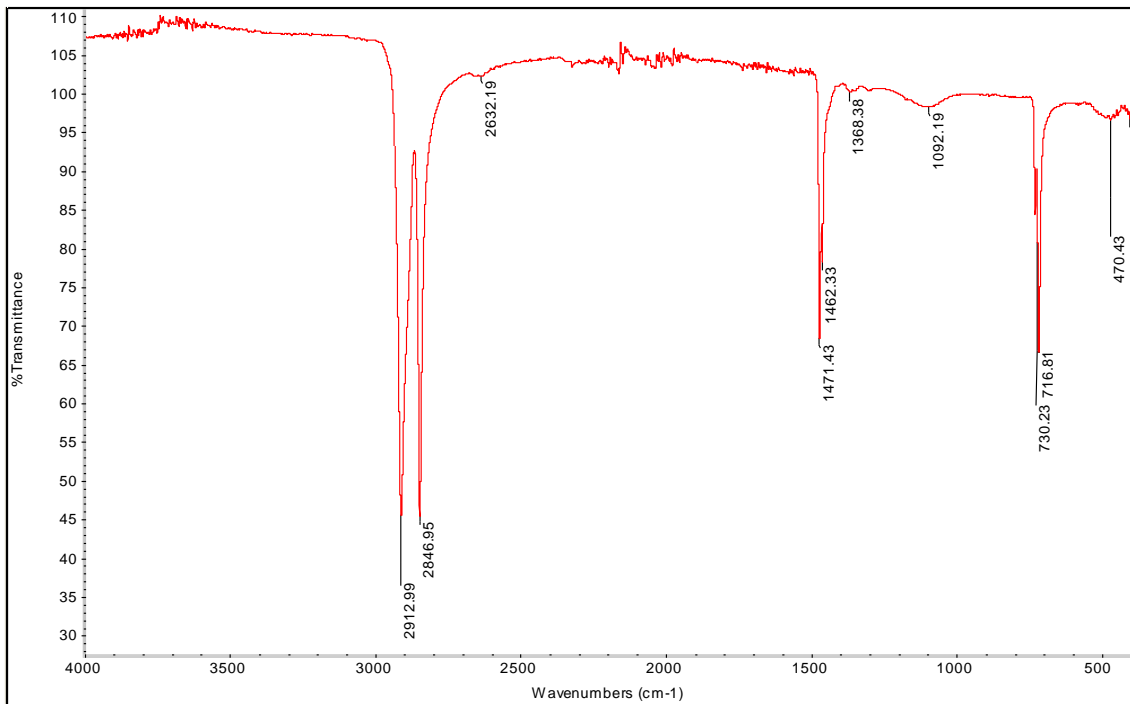


Fig.41. Espectro de absorción de la muestra B



**Fig.42. Espectro de absorción de la muestra C**



**Fig.43. Espectro de absorción de la muestra D.**

Como hemos podido observar las cuatro muestras, tienen un espectro de absorción muy similar.

Las vibraciones en moléculas poliatómicas son mucho más complejas que en una molécula diatómica que sólo puede vibrar en un modo (stretching).

El número de modo independientes de vibración de una molécula de  $N$  átomos se calcula asumiendo que el movimiento de cada átomo se puede describir en términos de desplazamiento a lo largo de tres direcciones espaciales,  $3N$ . Tres combinaciones de esos desplazamientos resultan en el movimiento de toda la molécula en el espacio. Si la molécula no es lineal, otras tres combinaciones especifican la rotación de la molécula alrededor de su centro de masas, por lo que quedan  $3N-6$  combinaciones de desplazamientos, que son las distorsiones de la molécula que nos interesa. (Moreno, J and Fernández J, 2014).

En muchos casos, aunque el movimiento sea colectivo, se puede identificar si es de tipo Stretching o bending. Las absorciones stretching de un enlace aparecen a frecuencias más altas que las correspondientes absorciones de tipo bending, debido a que la excitación de un modo asimétrico requiere mayor consumo de energía.

#### Región de vibración de extensión X-H ( $4500-2500\text{ cm}^{-1}$ )

Esta absorción corresponde a la extensión de enlaces con hidrógeno (alcoholes, aminas y enlaces C-H) y no se ve muy afectada por el resto de la molécula, apareciendo bandas constantes en estas zonas.

Claramente nuestras muestras se tratan de compuestos orgánicos, conteniendo al menos un centro alifático, debido a que aparecen vibraciones de tipo Stretching C-H de los grupos metilo y metileno ( $3000-2850\text{ cm}^{-1}$ )

#### Región del triple enlace ( $2500-2000\text{ cm}^{-1}$ )

En esta región absorbe un número muy limitado de compuestos de modo que su presencia se hace evidente, apareciendo triples enlaces del carbono con el nitrógeno, oxígeno, carbono etc. Como podemos observar en nuestras muestras no aparecen picos en esta área.

### Región del doble enlace (2000-1500 $\text{cm}^{-1}$ )

Las bandas principales se deben al grupo carbonilo C=O (1830-1650  $\text{cm}^{-1}$ ) y al doble enlace C=C, siendo la primera más intensa que la segunda y una de las más fáciles de reconocer en el espectro. Como podemos observar en nuestras muestras no aparecen picos de absorción en este rango.

### Región de huella dactilar (2000-1500 $\text{cm}^{-1}$ )

En esta región del espectro pequeñas diferencias en la composición de una molécula dan como resultado cambios importantes en la distribución de los picos. La correspondencia de dos espectros en esta región constituye una prueba de identidad. Muchos enlaces sencillos absorben en esta región, por lo que es muy complejo interpretar de forma exacta el espectro en esta zona. Pero es esta complejidad y singularidad la que permite la utilidad de identificación como huella dactilar.

A grandes rangos podemos determinar que va a ser en esta zona dónde van a aparecer los grupos funcionales que contienen a los elementos traza anteriormente observados. Como resumen, aparece en todas las muestras grupos silanos (entorno a 1400  $\text{cm}^{-1}$ ) y compuestos siloxanos.

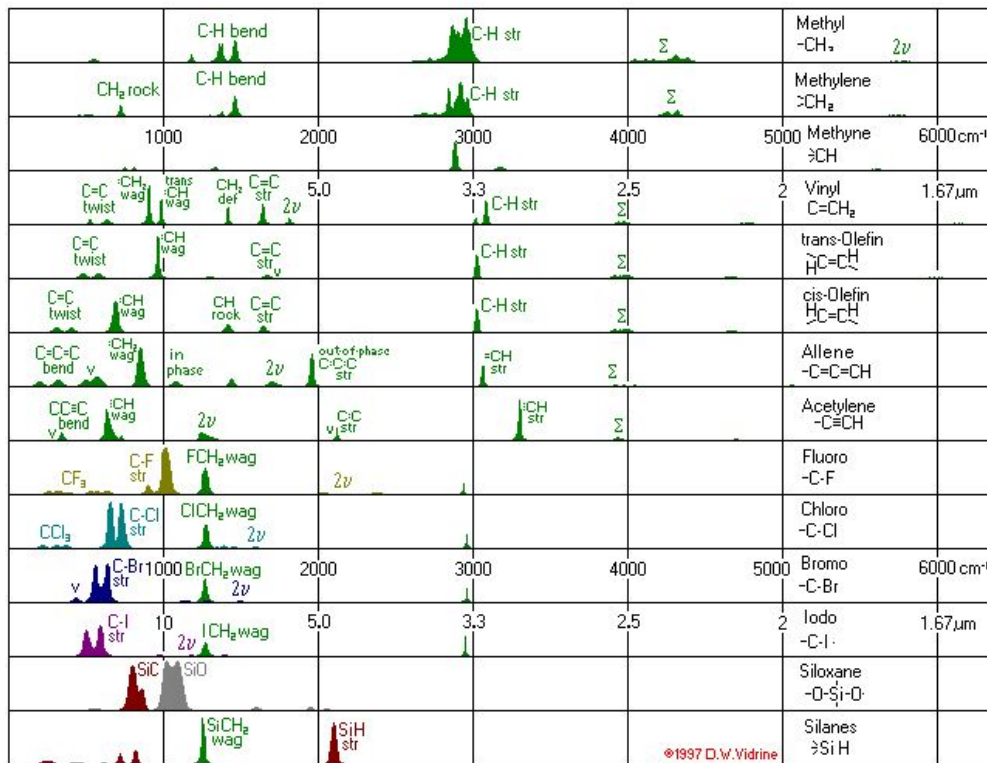


Fig.44. Principales picos de absorción de compuestos alifáticos. Fuente: Chemistry webBook

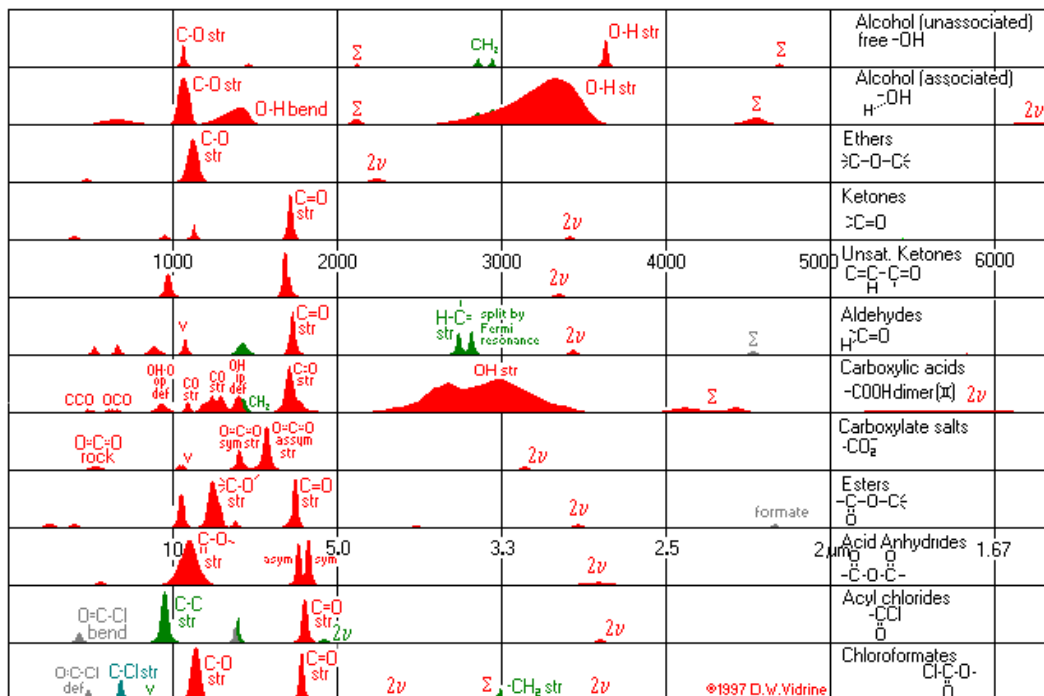


Fig.45. Principales picos de absorción de compuestos del oxígeno. Fuente: Chemistry webBook



Los resultados FTIR muestran grupos característicos presentes en el material de estudio, permitiendo identificar la estructura química de las muestras (Polietileno). El polietileno, va a propiciar, que los microplásticos se encuentre durante más tiempo en la columna de agua, a diferencia que el poliestireno que es más fácil que sedimente (Thomsom *et al.*, 2004).

#### 4.5. MICROTOX

Para una interpretación más adecuada de los datos de toxicidad, se emplean los parámetros Unidades de Toxicidad (TU) o Índice de Impacto de Toxicidad (TII50), expresados ambos como:

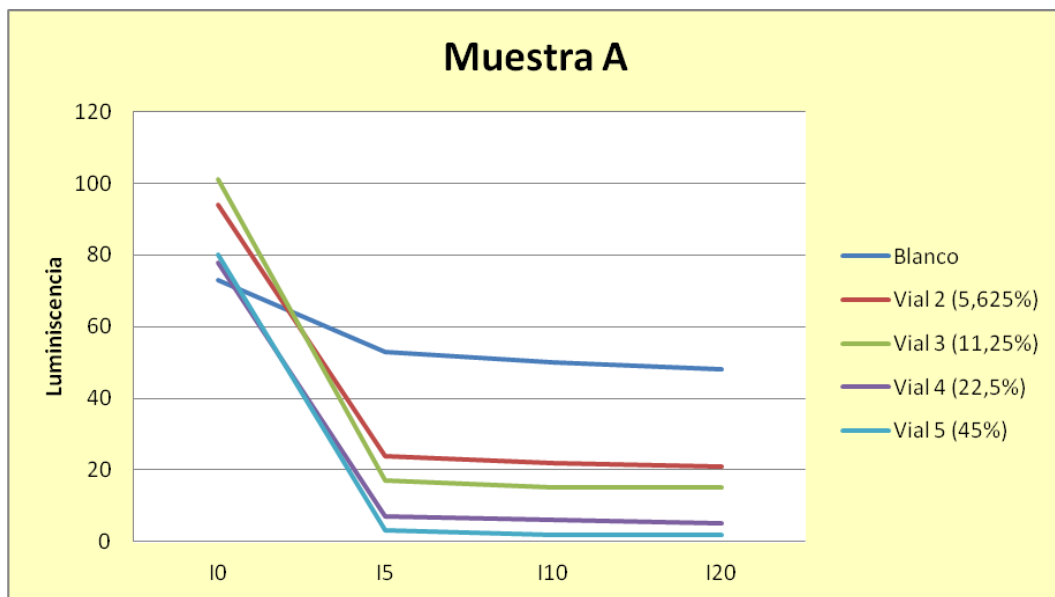
$$TU = TII_{50} = Equitox / m^3 = \frac{1}{EC_{50}} \times 100$$

Como se observa, ambos parámetros se calculan de la misma forma, pero tienen significados distintos y, por ello, una nomenclatura diferente. Así, mientras el parámetro Unidades de Toxicidad hace referencia a una cantidad de una sustancia conocida, el Índice de Impacto de Toxicidad se refiere a una cantidad de una mezcla de composición desconocida. Por tanto, será este último parámetro el que se emplee en el estudio de la toxicidad de aguas residuales.

Puesto que está expresado en %, nos permitirá la comparación de la toxicidad de distintas aguas. En España, la legislación denomina a este parámetro TII50 como Equitox/m<sup>3</sup>.

**Tabla 11. Ensayo microtox® muestra A.**

Muestra A	Blanco	Vial 2 (5,625%)	Vial 3 (11,25%)	Vial 4 (22,5%)	Vial 5 (45%)	
	73	94	101	78	80	l0
	53	24	17	7	3	l5
	50	22	15	6	2	l10
	48	21	15	5	2	l20



**Fig.46. Evolución de la luminiscencia en el ensayo microtox®. Muestra A.**

**Tabla 12. Ensayo microtox® muestra B.**

Muestra B	Blanco	Vial 2 (5,625%)	Vial 3 (11,25%)	Vial 4 (22,5%)	Vial 5 (45%)	
	92	91	93	90	80	l0
	51	49	50	50	38	l5
	49	47	48	48	37	l10
	47	47	49	49	34	l20

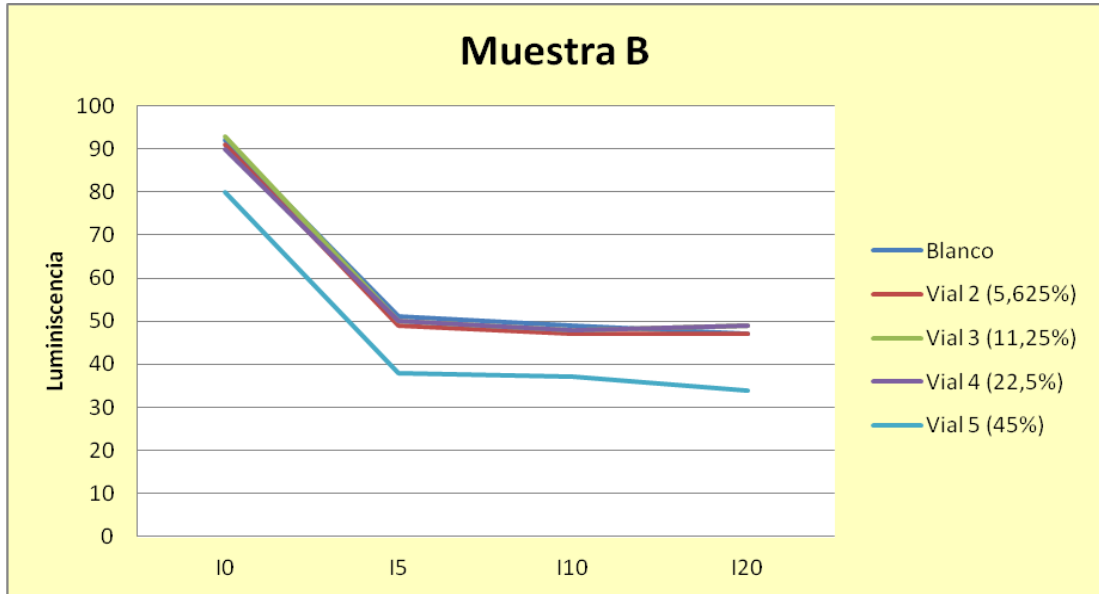


Fig.47. Evolución de la luminiscencia en el ensayo microtox®. Muestra B.

Tabla 13. Ensayo microtox® muestra C.

	Blanco	Vial 2 (5,625%)	Vial 3 (11,25%)	Vial 4 (22,5%)	Vial 5 (45%)	
<b>Muestra C</b>	71	65	59	63	60	10
	67	51	41	32	22	15
	66	47	37	28	20	110
	63	45	35	26	20	120

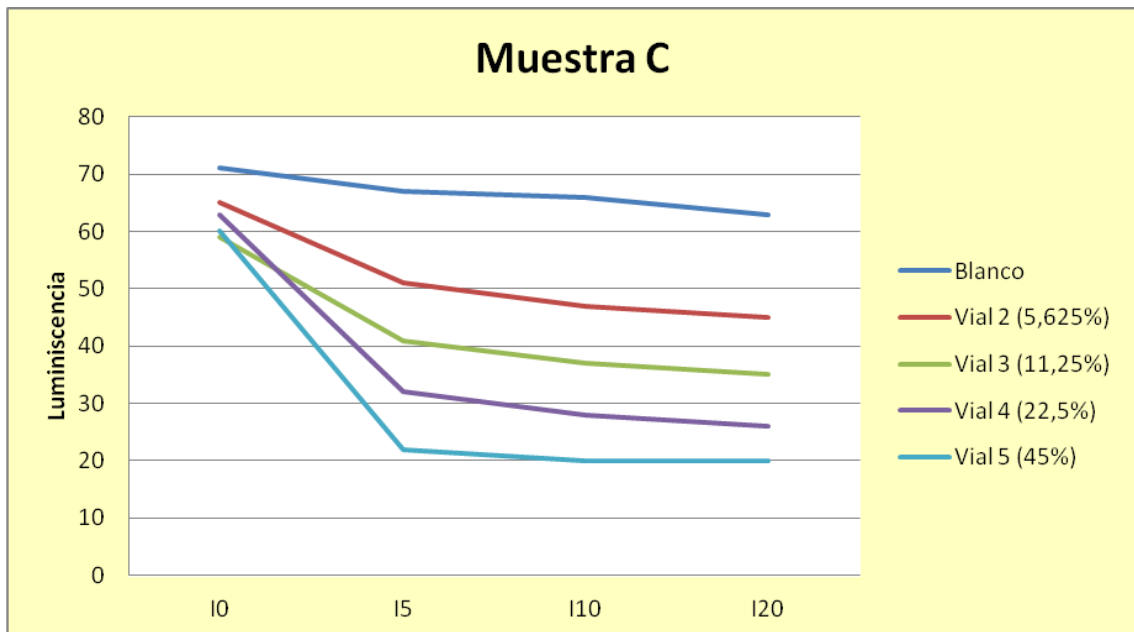
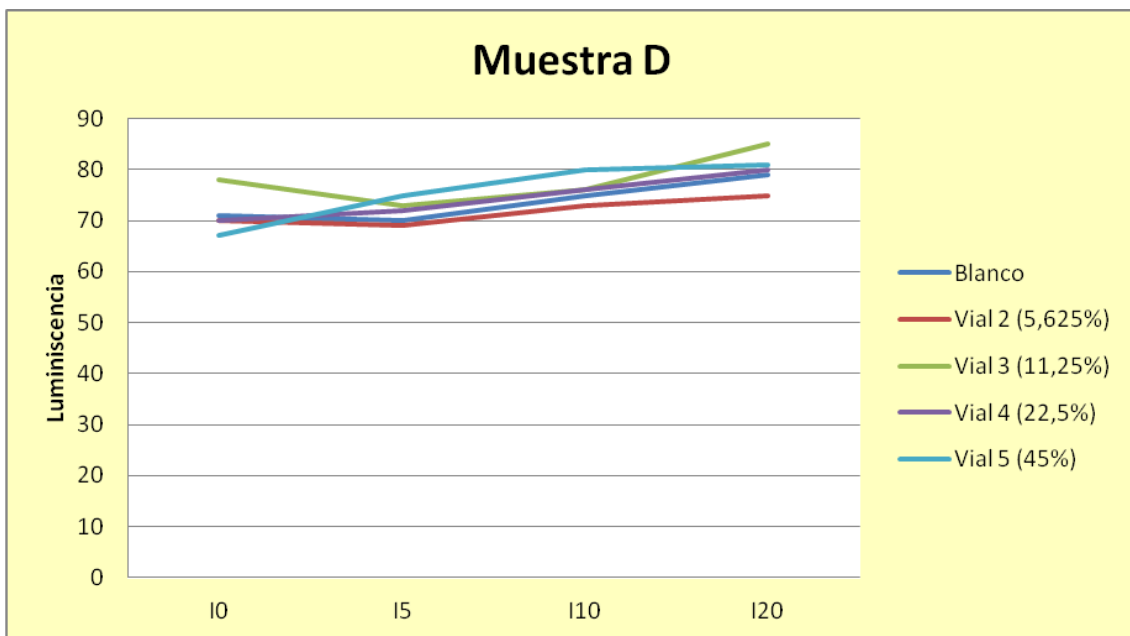


Fig.48. Evolución de la luminiscencia en el ensayo microtox®. Muestra C.

**Tabla 14. Ensayo microtox® muestra D.**

	Blanco	Vial 2 (5,625%)	Vial 3 (11,25%)	Vial 4 (22,5%)	Vial 5 (45%)	
<b>Muestra D</b>	71	70	78	70	67	l0
	70	69	73	72	75	l5
	75	73	76	76	80	l10
	79	75	85	80	81	l20



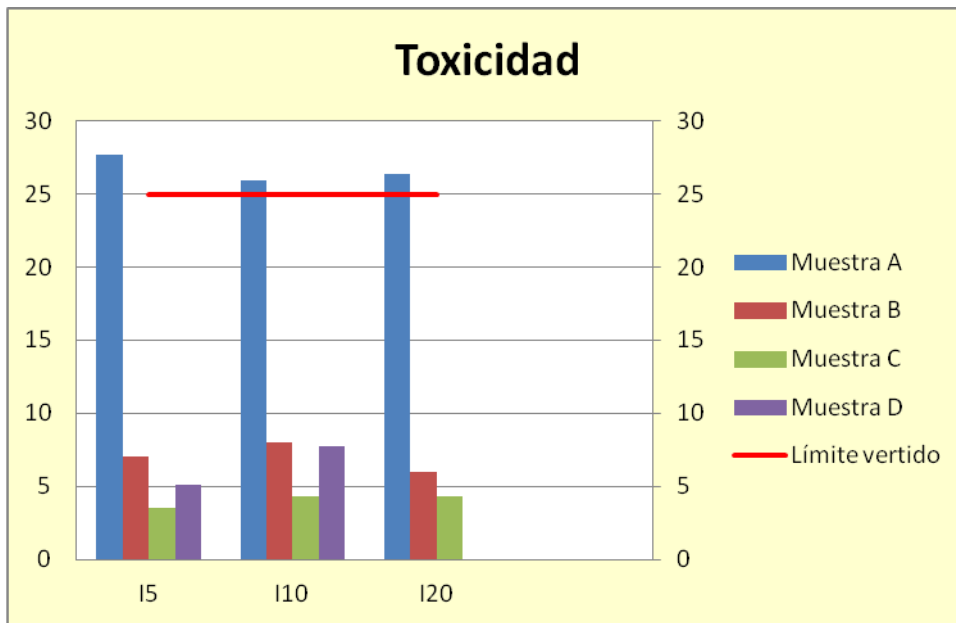
**Fig.49. Evolución de la luminiscencia en el ensayo microtox®. Muestra D.**

**Tabla 15. Concentración letal 50 de las diferentes muestras obtenidas mediante el ensayo microtox®.**

	l5	l10	l20	<b>EC(50) (%)</b>
<b>Muestra A</b>	3,609	3,859	3,796	
<b>Muestra B</b>	14,31	13,16	16,81	
<b>Muestra C</b>	28,4,43	22,98	23,15	
<b>Muestra D</b>	19,7	13	-	

**Tabla 16. Toxicidad de las diferentes muestras obtenida mediante el ensayo microtox®.**

	I5	I10	I20	
<b>Muestra A</b>	27,71	25,91	26,34	<b>TU (Eq/m3)</b>
<b>Muestra B</b>	7	8	6	
<b>Muestra C</b>	3,52	4,35	4,32	
<b>Muestra D</b>	5,073	7,761	-	



**Fig.50. Toxicidad de las distintas muestras y límite de vertido.**

El estudio Microtox® ha determinado que la muestra A es la más tóxica de las analizadas, encontrándose incluso fuera de la especificación de vertido a cauce público. Los datos parecen indicar que esta toxicidad es debida al dióxido de Titanio.

Actualmente hay un debate abierto en la comunidad científica, puesto que hay muchos autores que indican que este elemento sería tóxico para el medio ambiente e incluso peligroso para los humanos, debido a que las nanopartículas de dióxido de titanio poseen características físico-químicas diferentes a las macromoléculas pudiendo alterar las propiedades biológicas de los organismos (Shi *et al.*, 2013). Sin embargo, no existen todavía estudios epidemiológicos que relacionen la exposición a nanopartículas de dióxido de titanio con una incrementación significativa del riesgo de padecer cáncer.

La ingesta del dióxido de titanio puede producirse por diferentes vías:

- Inhalación. Mediante la aspiración de sprays antimicrobianos que contienen este elemento.
- Oral. A través de la ingesta de productos alimenticios que contiene concentraciones de nanopartículas de óxido de titanio que actúan como aditivos.
- Intravenosa. Este tipo de introducción en el cuerpo humano estaría casi restringida a la aplicación de fármacos y otros compuestos de carácter sanitario.
- Absorción dermatológica. Este tipo de absorción es de gran interés debido a que como hemos comentado anteriormente, existe una amplia gama de productos cosméticos que contienen este compuesto.

Los principales efectos descritos son:

- Inducción a la inflamación nefrítica, de vías respiratorias, etc. (Lu *et al.*, 1998, Moon *et al.*, 2010)
- Neumonía, metaplasia (Warheit *et al.*, 1997).
- Defectos en la funciones de los macrófagos y acumulación en las septas interarveolares. (Lee *et al.*, 1985, Warheit *et al.*, 1997).
- Estudios recientes han determinado que juegan un papel importante en la traducción celular, pudiendo causar alteraciones importantes, participando activamente en la etiología del cáncer. (Shi *et al.*, 2013, Huang *et al.*, 2009).

La mayoría de los estudios realizados para conocer los efectos sobre la salud del ser humano han sido realizados en ratas y cerdos y posteriormente extrapolados mediante modelos matemáticos.

La mayoría de biotests realizados con partículas de dióxido de titanio han determinado una toxicidad nula o casi nula en la bacteria *Vibrio fischeri* (García, *et al.*, 2011. Strigul *et al.*, 2009). Esta diferencia con nuestro estudio puede estar

relacionada con las interacciones y reacciones fotoquímicas que puede sufrir el dióxido de titanio con la radiación ultravioleta y otras sustancias químicas, aumentando de esta manera su toxicidad. Los distintos autores han determinado la toxicidad para nanopartículas altamente puras, por lo que esta puede ser la principal razón que justifica los distintos valores de toxicidad, ya que, puede ser que hayamos analizado mediante el microtox®, algún compuesto intermedio.





## 5. Conclusiones.

Se ha llevado a cabo el estudio y análisis de los microplásticos contenidos en cuatro limpiadores faciales comerciales, con objeto de examinar sus características físicas y químicas, así como su toxicidad para el medio ambiente. Teniendo en cuenta los resultados obtenidos, podemos extraer las siguientes conclusiones para el presente Trabajo Fin de Máster:

- Las formas detectadas mediante microscopía electrónica de barrido fueron muy variadas, aunque predominaban las formas elipsoidales.
- La espectroscopía de dispersión de rayos X mostró la presencia de diferentes microelementos en los cuatro limpiadores faciales, destacando la presencia de titanio en el limpiador facial A.
- Se presenta una gran variabilidad de tamaños para cada uno de los microplásticos estudiados en los cuatro limpiadores faciales, encontrándose las muestras analizadas en tamaños medios entre 70 y 190  $\mu\text{m}$ , siempre inferiores a los encontrados en otros estudios similares.
- La presencia de grupos funcionales silano y siloxanos en estos microplásticos indica su potencial efecto adsorbente de metales pesados u otros compuestos orgánicos presentes en los vertidos.
- Tanto la Muestra A como la Muestra D presentan nanopartículas de microplásticos, siendo las que mayor impacto sobre la cadena trófica van a producir, pero curiosamente el limpiador facial A fue uno de los más baratos (39,67 € / L) y la marca D el más caro (106,75 € / L). Por lo que van a afectar de forma similar al medio ambiente.
- La presencia de polietileno como constituyente de los microplásticos incluidos en los limpiadores faciales analizados, con una densidad específica inferior a 1, hará que estos floten en la columna de agua, provocando un mayor impacto en los organismos planctónicos por su mayor biodisponibilidad.
- Únicamente la muestra de la marca A presentó valores de toxicidad aguda por encima de lo establecido en nuestro Decreto 16/1999 de

vertidos industriales al alcantarillado, debido a la presencia de titanio en su composición. Este valor de toxicidad, se debe a las distintas interacciones que ha sufrido el dióxido de titanio.

- El amplio rango de tamaños y formas detectadas hace que estos microplásticos estén bastante disponibles para los primeros organismos más pequeños de la cadena trófica.
- La legislación deberá de adaptarse a este nuevo contaminante y regular su uso, tamaño y composición, para minimizar los impactos sobre el ecosistema y la cadena trófica.

## 6. Bibliografía.

- Andrady, A. (2011). *Microplastics in the marine environment*. Marine Pollution Bulletin 62, 1596–1605.
- Ashton, K., Holmes, L., Turner, A., (2010). *Association of metals with plastic production pellets in the marine environment*. Marine Pollution Bulletin 60, 2050–2055.
- ASTM D833-46. (1955). *Methods of Identification and Quantitative Analysis of Synthetic Elastomers* (Withdrawn 1959).
- Bayo, J. 2012. *Kinetic studies for Cd(II) biosorption from treated urban effluents by native grapefruit biomass (Citrus paradise L.): The competitive effect of Pb(II), Cu(II) and Ni(II)*. *Chemical Engineering journal* 191: 278-287.
- Benner, J., Helbling, D., Kohler, H., Wittebol, J., Kaiser, E., Prasse, C., Ternes, A., Albers, C., Aamand, J., Horemans, B., Springael, D., Walravens, E and Boon, N. (2013). *Is biological treatment a viable alternative for micropollutant removal in drinking water treatment processes?*. *Water Research*. 47. 5955-5976.
- Browne, M.; Dissayanake, A.; Galloway, T.; Lowe, D. and Thompson, R. (2008). *Ingested microplastic translocates to the circulatory system of the mussel, Mytilus edulis*. *Environ. Sci. Technol.* 42, 5026–5031.
- Bulich, A. A. (1979). *Use of luminiscent bacteria for determining toxicity in aquatic environments*. *Aquatic Toxicology*. ASTM 667. American Society for Testing Materials. Pp. 98-106.
- Casado, M.; Campisi, T.; Díaz, A.; Lore, R.; Obispo.; R. Postma, J.; Riba, I.; Sneekes, A.; Buceta, J and Del Valles, T. (2006). *Interlaboratory assessment of marine bioassays to evaluate the environmental quality of coastal sediments in Spain.II. Bioluminescence inhibition test for rapid sediment toxicity assessment*. *Ciencias Marinas*. 32 (1B): 129-138.

Cauwenbergue, L.; Vanreusel, A.; Mees, J and Janssen, C. (2013) *Microplastics pollution in deep-sea sediments*. Environmental Pollution 182 495e499.

Chemistry webbook. Disponible: <http://webbook.nist.gov/chemistry/> Consultada: 25/07/2014

Claessens, M.; Van-Cauwenberghe, Lisbeth.; Vandegheuchte, M. and Janssen C. (2013) *New techniques for the detection of microplastics in sediments and field collected organisms*. Marine Pollution Bulletin 70 227–233.

Claessens, M.; De Meester, S., Van Landuyt, L.; De Clerck, K. and Janssen, C. (2011). *Occurrence and distribution of microplastics in marine sediments along the Belgian coast*. Marine Pollution Bulletin 62 2199–2204.

Cole, M.; Lindique, P.; Halsband, C. and Galloway, T. (2011) *Microplastics as contaminants in the marine environment: a review*. Marine Pollution Bulletin 62 2588–2597.

Decreto N.º 16/1999, de 22 de abril, sobre Vertidos de Aguas Residuales Industriales al Alcantarillado.

Derraik, J., (2002). *The pollution of the marine environment by plastic debris: a review*. Marine Pollution Bulletin 44, 842–852.

Directiva 93/67/CEE de la comisión, de 20 de Julio de 1993, por la que se fijan los principios de evaluación del riesgo, para el ser humano y el medio ambiente, de las sustancias notificadas de acuerdo con la directiva 67/548/CEE del Consejo (Doce L 227, de 8 de septiembre).

Do Sul, J and Costa, M. (2013) *The present and future of microplastics pollution in the marine environment*, Environmental Pollution xxx 1a13.

Engler, R.E., (2012). The complex interaction between marine debris and toxic chemicals in the ocean. Environ. Sci. Technol. 46, 12302e12315.

Eriksen, M.; Mason, S.; Wilson, S.; Box, C.; Zellers, A.; Edwards, W.; Farley, H. and Stephen, A. (2013). *Microplastics pollution in the surface waters of the Laurentian great lakes*. Marine Pollution Bulletin 77 (2013) 177–182.

Fendall, L and Sewell, Mary. (2009). *Contributing to marine pollution by washing your face: Microplastics in facial cleansers*. Marine Pollution Bulletin 58 1225–1228.

Feschet-Chassot, E., Raspal, V., Sibaud, Y., Awitor, O., Bonnemoy, F., Bonnet, F and Bohatier, J. (2011) *Tunable functionality and toxicity studies of titanium dioxide nanotube layers*. Thin solid films. 519. 2564-2568.

Fossi, M.C., Panti, C., Gurranti, C., Coppola, D., Giannetti, M., Marsili, L., Minutoli, R., (2012). *Are baleen whales exposed to the threat of microplastics? A case study of the Mediterranean fin whale (Balaenoptera physalus)*. Marine Pollution Bulletin 64 (11), 2374e2379.

García, A., Espinosa, R., Delgado, L., Casals, E., González, E., Puentes, V., Barata, C., Font, X and Sánchez, A. (2011). *Acute toxicity of cerium oxide, titanium oxide and iron oxide nanoparticles using standardized tests*. Desalination. 269. 136-141.

Huang S, Chueh PJ, Lin YW, Shih TS, Chuang SM. (2009). *Disturbed mitotic progression and genome segregation are involved in cell transformation mediated by nano-TiO<sub>2</sub> long-term exposure*. Toxicol Appl Pharmacol, 241:182–194.

Inouye S. (1994). *NAD(P)H-flavin oxidoreductase from the bioluminescent bacterium, Vibrio fischeri ATCC 7744, is a flavoprotein*. FEBS Lett; 347:163–8.

Lee KP, Trochimowicz HJ, Reinhardt CF (1985). *Pulmonary response of rats exposed to titanium dioxide (TiO<sub>2</sub>) by inhalation for two years*. Toxicol Appl Pharmacol, 79:179–192.

Ley 10/1993, de 26 de octubre, sobre *Vertidos Líquidos Industriales al Sistema Integral de Saneamiento*.

Lu PJ, Ho IC, Lee TC. (1998) *Induction of sister chromatid exchanges and micronuclei by titanium dioxide in Chinese hamster ovary-K1 cells*. *Mutat Res*, 414:15–20.

Martins, J., Sobral, P., (2011). Plastic marine debris on the Portuguese coastline: a matter of size? *Marine Pollution Bulletin* 62 (12), 2649e2653.

Mansfield, C., Alloy, M., Hamilton, J., Verbeck, G., Newton, K., Klaine, J and Roberts, A. (2015). *Photo-induced toxicity of titanium dioxide nanoparticles to Daphnia magna under natural sunlight*. *Chemosphere* 120. 206-210.

Menz, J.; Scheneider, M. and Kümmerer. (2013). *Toxicity testing with luminescent bacteria. Characterization of an automated method for the combined assessment of acute chronic effects*.

Moon C, Park HJ, Choi YH, Park EM, Castranova V, Kang JL. (2010). *Pulmonary inflammation after intraperitoneal administration of ultrafine titanium dioxide (TiO<sub>2</sub>) at rest or in lungs primed with lipopolysaccharide*. *J Toxicol Environ Health A*, 73:396–409.

Moreno, J and Fernández, J, (2014). *Asignatura Técnicas instrumentales avanzadas de análisis*. Máster de Ingeniería Ambiental y Procesos Sostenibles. UPCT.

Ng, K. and Obbard, J. (2006). *Prevalence of microplastics in Singapore's coastal marine environment*. *Marine Pollution Bulletin* 52 761–767.

Noren, F., Naustvoll, F., (2010). *Survey of Microscopic Anthropogenic Particles in Skagerrak*. Commissioned by KLIMA- OG FORURENSNINGSDIREKTORATET, Norway.

Plastics Europe (2013). *Analysis of Plastics Production, Demand and Recovery in Europe*; Plastics Europe, Association of Plastic. Manufacturers: Brussels.

Pretsch E., Bühlmann P. & Affolder C. (2000). *Structure Determination of Organic Compounds*. Tables of spectral data. 3rd ed. Berlin: Springer. 421p.

Ramirez P. and Mendoza. A. (2008). *Ensayos toxicológicos para la evaluación de sustancias químicas en agua y suelo*. La experiencia en México. Pag 307-317. ISBN 978-968-817-882-9.

Ribo, J.; Canela, M; Griful, E. (2000). *Repeatability and Reproducibility of the luminiscent bacteria Bioassay*. Environmental toxicology. 16. 127 e 135.

Rios, L., Moore, C., Jones, P., (2007). *Persistent organic pollutants carried by synthetic polymers in the ocean environment*. Mar. Pollut. Bull. 54, 1230–1237.

Rosas, M. E. and Fernández J.L. (2012). *FTIR aplicada durante la deshidratación osmótica de mango Ataulfo (Magnifera indica)*. Superficies y Vacio 25 (1) 8-13.

Setälä, O.; Fleming, V.and Lehtiniemi, M. (2014). *Ingestion and transfer of microplastics in the planktonic food web*. Environmental Pollution 185.77e83.7

Seymour, R and Carraher, C. (2002). *Polymer Chemistry, an introduction*, third edition. Marcel Dekker Inc New York. ISBN-84-291-7926-7.

Shaw, D.G., Day, R.H., 1994. Colour- and form- dependent loss of plastic microdebris from the North Pacific Ocean. Marine Pollution Bulletin 28 (1), 39e43.

Shi, H., Magaye, R., Castranova, V and Zhao, J. (2013). *Titanium dioxide nanoparticles: a review of current toxicological data*. Particle and Fibre Toxicology.

Skoog, D., West, D., Holler, F and Crouch, S. (2005). *Fundamental of Analytical chemistry eighth edition*. Thompson editors. ISBN: 0-03-035523-0.

Sprague, J.B. and D.J.McLeay, (1992). *Biological test method: Toxicity test using luminescent bacteria (photobacterium phosphoreum)*. Environmental Protection Service, Report EPS 1/RM/24. 61 p.

Strigul, N., Vaccari, L., Galdun, C., Wazne, M., Liu, X., Cristodoulatos, C and Jasinkiewicz, K. (2009). *Acute toxicity of boron, titanium dioxide, and aluminum nanoparticles to Daphnia magna and Vibrio fischeri*. Desalination. 248. 771-782.

Thompson, R., Olsen, Y., Mitchell, R., Davis, A., Rowland, S., John, A., McGonigle, D and Russell, A. (2004). *Lost at Sea: where is all the plastic?* Science 304, 838.

Thompson, R., Moore, C., vom Saal, F., Swan, S. (2009). *Plastics, the environment and human health: current consensus and future trends*. Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences 364, 2153–2166.

Universidad Politécnica de Cartagena. Disponible en [www.upct.es/sait](http://www.upct.es/sait)  
Consulta: el 25/07/2014.

Ward, J., Shumway, S., (2004). *Separating the grain from the chaff: particle selection in suspension- and deposit-feeding bivalves*. J. Exp. Mar. Biol. Ecol. 300, 83–130.

Warheit DB, Hansen JF, Yuen IS, Kelly DP, Snajdr SI, Hartsy MA. (1997) *Inhalation of high concentrations of low toxicity dusts in rats results in impaired pulmonary clearance mechanisms and persistent inflammation*. Toxicol Appl Pharmacol. 145:10–22.



Weyer, K.; Ph,D. and Geol, P. (1995). *Vertical ranking of toxicity tests with luminescent bacteria*. International Association of Hydrogeologists Congress June 4-10. Edmonton, Alberta, Canada

Wright, S.; Thompson, R. and Galloway, T. (2013). *The physical impacts of microplastics on marine organisms: A review*. *Environmental Pollution*. 178, 483e492.

Xiaoyan, M.; Xiaochang, W.; Huu, N.; Wenshan. G.; Maoni, W and NA. W. (2014). *Science of the total environment*. 468-469. 1-11.