



**UNIVERSIDAD NACIONAL DE EDUCACIÓN A DISTANCIA  
MÁSTER UNIVERSITARIO EN CIENCIA Y TECNOLOGÍA QUÍMICA**

**TRABAJO DE FIN DE MÁSTER  
MÓDULO DE QUÍMICA ANALÍTICA**

**REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA DE LOS MÉTODOS  
DE ANÁLISIS DE MICRO(NANO)PLÁSTICOS  
EN EL MEDIOAMBIENTE Y EN LA BIOTA  
MARINA**

**Autor/a: M<sup>a</sup> Ángeles Toledo Martínez**

**Tutor/a: Pilar Fernández Hernández**

**FACULTAD DE CIENCIAS  
DEPARTAMENTO DE CIENCIAS ANALÍTICAS**

**Julio 2019**

<b>Tabla de abreviaturas.....</b>	<b>3</b>
<b>Índice de figuras.....</b>	<b>5</b>
<b>RESUMEN .....</b>	<b>6</b>
<b>1. Introducción .....</b>	<b>6</b>
<b>2. Justificación y objetivos.....</b>	<b>9</b>
<b>3. Tipos de plásticos.....</b>	<b>10</b>
3.1. Clasificación.....	11
3.2. Polietileno PE.....	14
3.3. Polipropileno PP.....	15
3.4. Poliestireno PS.....	16
3.5. Policloruro de vinilo PVC.....	17
3.6. Polietileno Tereftalato PET.....	18
<b>4. Definición de micro y nanoplásticos, composición y perspectiva actual .....</b>	<b>19</b>
4.1. Fuentes de contaminación plástica en el mar.....	19
4.2. Comportamiento de partículas plásticas en el mar .....	22
4.3. Efectos de los microplásticos en la biota marina .....	24
4.4. Toxicidad de los microplásticos.....	26
4.5. Toxicidad de los microplásticos en humanos.....	28
<b>5. Legislación vigente .....</b>	<b>29</b>
<b>6. Métodos de análisis de microplásticos y nanoplásticos.....</b>	<b>32</b>
6.1. Métodos de caracterización y detección.....	32
6.1.1. Muestreo.....	33
6.1.2. Pretratamiento y purificación.....	36
6.1.3. Separación.....	36
6.2. Digestión .....	39
6.2.1 Disección y limpieza.....	40
6.2.2. Homogeneización.....	40
6.2.3. Digestión .....	41
6.3. Identificación de microplásticos.....	45

6.3.1. Identificación visual .....	45
6.3.2. Microscopía electrónica de barrido (SEM).....	46
6.3.3. Fluorescencia.....	46
6.4. Detección y Cuantificación .....	47
6.4.1. Espectroscopía de Infrarrojo con Transformada de Fourier (FT-IR) .....	47
6.4.2. Raman .....	51
6.4.3. Pyr- GC.....	53
6.4.4. Otros métodos.....	55
<b>7. Limitaciones de las técnicas con respecto a la detección y cuantificación de microplásticos .....</b>	<b>56</b>
7.1. FT-IR.....	56
7.2. Raman .....	57
7.3. Pyr-GC.....	58
<b>8. Conclusiones.....</b>	<b>58</b>
<b>Bibliografía .....</b>	<b>60</b>

## Tabla de abreviaturas

<b>ABS</b>	Acrilonitrilo, Butadieno, Estireno
<b>AIO</b>	Air-induced overflow
<b>ATR</b>	Reflexión Total Atenuada
<b>CA</b>	Acetato de Celulosa
<b>CCD</b>	Dispositivo de Carga Acoplada
<b>COP</b>	Contaminantes Orgánicos Persistentes
<b>CTD</b>	Conductividad, Temperatura, Profundidad
<b>DCM</b>	Diclorometano
<b>DRIFTS</b>	Diffuse Reflectance Infrared Fourier Transform
<b>DSC</b>	Calorimetría Diferencial de Barrido
<b>ECHA</b>	European Chemicals Agency
<b>EDS</b>	Energy dispersive X-ray spectroscopy
<b>EDTA</b>	Ácido Etilendiamintetraacético
<b>EE.UU.</b>	Estados Unidos de América
<b>EFSA</b>	Agencia Europea de Seguridad Alimentaria
<b>EM-CCD</b>	Electron multiplying charged coupled device detectors
<b>EPS</b>	Poliestireno Expandido
<b>EVA</b>	Etilvinilacetato
<b>FPA</b>	Focal Plane Array
<b>FT-IR</b>	Transformada de Fourier con Espectroscopía de Infrarrojos
<b>GC</b>	Cromatógrafo de gases
<b>GES</b>	Good Environmental Status
<b>HDPE</b>	Polietileno de alta densidad
<b>HIPS</b>	Poliestireno de Alto Impacto
<b>HSI</b>	Imagen Hiperespectral
<b>ICES</b>	International Council for the Exploration of the Sea
<b>ICP</b>	Plasma acoplado inductivamente
<b>IR</b>	Infrarrojo
<b>LDPE</b>	Polietileno de baja densidad
<b>MP</b>	Microplásticos
<b>MS</b>	Espectrómetro de masas
<b>MSFD</b>	Marine Strategy Framework Directive
<b>NOAA</b>	National Oceanic and Atmospheric Administration
<b>NP</b>	Nanoplásticos
<b>NR</b>	Rojo de Nilo
<b>OES</b>	Espectroscopía de emisión óptica
<b>OMS</b>	Organización Mundial de la Salud
<b>PA</b>	Poliamida
<b>PAH</b>	Hidrocarburo Policíclico Aromático
<b>PBDE</b>	Éteres Difenil Polibrominados
<b>PC</b>	Policarbonato
<b>PCA</b>	Principal Component Analysis
<b>PCB</b>	Bifenilos Policlorados
<b>PDC</b>	Ácido 2-pirona-4,6-dicarboxílico
<b>PE</b>	Polietileno
<b>PET</b>	Polietileno Tereftalato

<b>PEVA</b>	Polietilenvinil Acetato
<b>POM</b>	Polioximetileno
<b>PP</b>	Polipropileno
<b>PS</b>	Poliestireno
<b>PSI</b>	Libras por pulgada cuadrada
<b>PU</b>	Poliuretano
<b>PVC</b>	Policloruro de Vinilo
<b>Pyr-GC</b>	Cromatografía de gases con pirólisis
<b>SBR</b>	Goma de Estireno Butadieno
<b>SDS</b>	Dodecil Sodio Sulfato
<b>SEM</b>	Microscopía electrónica de barrido
<b>SR</b>	Sincrotron
<b>TDS</b>	Desorción térmica
<b>TGA</b>	Análisis termogravimétrico
<b>ToF-SIMS</b>	Tiempo de vuelo con escaneo de espectrometría de masas
<b>XPS</b>	Espuma extrusionada

## **Índice de figuras**

<b>FIGURA 1: MECANISMO VÍA RADICALES LIBRES DE LA POLIMERIZACIÓN DEL PVC</b>	11
<b>FIGURA 2: ESTRUCTURA QUÍMICA DE LOS POLÍMEROS DE SILICONA</b>	13
<b>FIGURA 3: MONÓMERO DE ETILENO</b>	14
<b>FIGURA 4: LDPE</b>	14
<b>FIGURA 5: HDPE</b>	14
<b>FIGURA 6: MONÓMERO DE POLIPROPILENO</b>	15
<b>FIGURA 7: MATERIAL DE POLIPROPILENO EMPLEADO EN VASOS, FUNDAS, CUERDAS Y PAÑALES DESECHABLES</b>	16
<b>FIGURA 8: MONÓMEROS DE ESTIRENO</b>	16
<b>FIGURA 9: MATERIAL DE POLIESTIRENO EMPLEADO EN ENVASES DESECHABLES, AISLANTES TERMOACÚSTICOS, PAJITAS E INSTRUMENTAL MÉDICO DESECHABLE</b>	17
<b>FIGURA 10: MONÓMERO DE CLORURO DE VINILO</b>	17
<b>FIGURA 11: MATERIAL DE PVC EMPLEADO EN TUBERÍAS, MANGUERAS Y MARCOS PARA VENTANAS</b>	18
<b>FIGURA 12: MONÓMERO DE PET</b>	18
<b>FIGURA 13: MATERIAL DE PET EMPLEADO EN FIBRAS DE RELLENO Y BOTELLAS</b>	18
<b>FIGURA 14: RESTOS DE PLÁSTICO EN JUMEIRAH BEACH (DUBAI, EAU), MARZO 2019.</b>	21
<b>FIGURA 15: RESIDUOS PLÁSTICOS EN MYANMAR, SEPTIEMBRE 2016</b>	22
<b>FIGURA 16: MUESTREADOR CTD ROSETA</b>	35
<b>FIGURA 17: CONFIGURACIÓN EXPERIMENTAL DEL MÉTODO AIO</b>	37
<b>FIGURA 18: REACCIÓN DE DISOLCUIÓN DE CONCHAS CALIZAS CON ÁCIDO CLORHÍDRICO</b>	40
<b>FIGURA 19: DIAGRAMA PARA LA DIGESTIÓN DE MICROPLÁSTICOS EN MUESTRAS BIOLÓGICAS</b>	41
<b>FIGURA 20: DISPERSIÓN DE LA LUZ POR LAS MOLÉCULAS</b>	51
<b>FIGURA 21: INFORMACIÓN OBTENIDA A PARTIR DEL PICO DEL ESPECTRO RAMAN</b>	52

## **RESUMEN**

La gran versatilidad que aportan los plásticos como materiales a la hora de fabricar objetos de consumo es en parte la causa de los problemas que sus residuos generan en el medioambiente. Gracias a los plásticos hemos podido no solo reemplazar otros materiales de origen natural, sino fabricar objetos más ligeros y duraderos, abaratando costes. Aunque podamos someter a los plásticos a procesos de reciclado o reutilización, la degradación de estos objetos de forma natural provoca la fragmentación de los mismos dando lugar a lo que conocemos como micro y nanoplásticos. Las definiciones de lo que se considera micro y nanoplásticos aún no se encuentran consensuadas.

Existe una tendencia creciente en los últimos años hacia la investigación y monitorización de las concentraciones de micro y nanoplásticos en el medioambiente. Los métodos de muestreo, detección y cuantificación no se encuentran estandarizados, debido a las características intrínsecas de los materiales y a la procedencia de las muestras, por lo que la comparación de datos entre diferentes estudios resulta una tarea complicada.

En este trabajo se realiza una revisión de los métodos de análisis existentes en la literatura, así como de las ventajas y limitaciones que presentan, desde la toma de muestras hasta la cuantificación y detección. También se analizan los impactos y repercusiones que los micro y nanoplásticos tienen en la biota marina y su toxicidad en caso de llegar hasta el ser humano a través de la cadena alimentaria.

### **1. Introducción**

Los plásticos son uno de los materiales más versátiles y valiosos tanto para la industria como para nuestra vida diaria. Sus características hacen de ellos materiales relativamente baratos, ligeros y resistentes, lo que comporta beneficios a la hora de diseñar una gran variedad de productos, pero también graves problemas de contaminación en el medioambiente y en los ecosistemas de agua dulce y marinos, cuyo impacto está todavía en proceso de estudio<sup>1</sup>.

Existen infinidad de tipos de polímeros, aunque entenderemos los plásticos como sustancias químicas sintéticas, a diferencia de los polímeros de origen natural como pueden ser las proteínas, la celulosa, el almidón, la lignina o el caucho natural. Entre los plásticos de consumo más utilizados encontramos el polietileno (PE), el polipropileno (PP), el poliestireno (PS), el policloruro de vinilo (PVC) y el polietilentereftalato (PET). Dentro de la categoría de plásticos también podemos incluir las fibras, los recubrimientos y las gomas. Cada tipo de

plástico puede a su vez contener una serie de aditivos para modificar sus propiedades que también pueden terminar afectando al medioambiente.

Los esfuerzos de reutilización y reciclaje no siempre dan los resultados deseados y una gran cantidad de los plásticos producidos termina como residuos, suponiendo una amenaza para el entorno. Si no se toman medidas con soluciones urgentes al ritmo actual de desechos se calcula que para el año 2050 los océanos contendrán más plástico en peso que peces<sup>2</sup>. Los plásticos sufren, además, procesos de degradación de tipo químico o físico, lo que causa su fragmentación acabando en partículas de tamaño inferior o en fibras. Cuando el tamaño de estos fragmentos es inferior a 5 mm se conocen como microplásticos<sup>3</sup> (MP) y a partir de 1 nm se considera nanoplásticos<sup>4</sup> (NP).

Los MP suelen encontrarse mayoritariamente en forma de fibras, fragmentos y pequeñas esferas. Otros contribuyentes son los fragmentos procedentes de la degradación de films, cuerdas, filamentos, esponjas, espumas, gomas y microesferas, así como de otros materiales de mayor tamaño<sup>5</sup>. La degradación de estos materiales en medios marinos se debe fundamentalmente a la acción de microorganismos, la luz UV, el agua o el mecanizado por parte de las olas y la abrasión de la arena, aumentan la fragilidad del material dando lugar a roturas o a sitios de ataque por parte de otros elementos.

En los últimos años existe una creciente preocupación por la cantidad de plástico existente en el planeta y por el problema que suponen los micro y nanoplásticos en el medioambiente y en su biota. La necesidad no solo de reducir las cantidades de plásticos usadas mundialmente, sino de recoger y reutilizar las ya existentes, es obvia y urgente. Aunque existen estudios sobre análisis de microplásticos en muestras de suelos<sup>6</sup>, aguas fluviales o plantas de tratamiento de aguas<sup>7, 8</sup>, la gran mayoría de trabajos se centran en el medioambiente y en la biota marinas, ya que el mar es el destino final de todas las rutas anteriores.

El plástico está presente en los océanos desde hace décadas, pero solo recientemente hemos tomado conciencia de la gravedad de un problema que es global y afecta a todos los sectores de la sociedad. Entre los años 1970 y 1980 se asumía que el plástico vertido al mar se concentraba solo en las zonas costeras hasta que, a finales de los 90, grandes concentraciones de plásticos fueron localizadas en el Pacífico Norte, convirtiéndolo en un problema que precisaba ser tratado y solucionado a varios niveles<sup>9</sup>. A principios de los años 80 del siglo XX surgieron los primeros esfuerzos para intentar encontrar soluciones y financiación a los problemas originados por las basuras encontradas en el medio marino<sup>10</sup>. La preocupación principal por aquel entonces era la cantidad de especies marinas que acaban

atrapadas en redes de pesca o en desperdicios plásticos, o que los ingerían, contribuyendo a aumentar sus índices de mortalidad.

Podemos encontrar objetos fabricados con plásticos en todas partes del mundo. Muchos objetos plásticos de uso común son desechables y de un solo uso. Existen pocos incentivos para su reciclaje y recuperación lo que genera grandes cantidades de desechos que en muchas ocasiones acaban siendo vertidas en el medioambiente. Aproximadamente, unos 10 millones de toneladas<sup>11</sup> de plásticos acaban cada año en el mar como residuos, siendo los países costeros asiáticos los que más contribuyen a ello. Además de provocar daños en el medioambiente, los desechos plásticos causan otros daños a la economía en sectores como el turismo, la pesca o la navegación.

En la actualidad hay más de 5300 tipos de polímeros sintéticos comercializados<sup>12</sup> cuya heterogeneidad dificulta su análisis. Las fuentes de las que proceden son varias, desde microperlas utilizadas en productos de higiene personal, a la degradación de objetos de plástico más grandes que se han vertido como residuos. Los cambios y las distintas situaciones demográficas también influyen en la cantidad y tipos de plásticos encontrados en distintas fuentes medioambientales. Otro problema añadido son los largos tiempos de residencia de las partículas de plástico, lo que hace que acaben acumulándose, generando los problemas a los que hoy en día nos enfrentamos. Eriksen et al.<sup>13</sup> estiman que hay al menos 5.25 billones de partículas de plástico flotando en el mar, con un peso total de 268,940 toneladas.

La presencia de plásticos y otros residuos de origen antropogénico en especies marinas de consumo es motivo de preocupación por el impacto en la salud humana que ello pueda conllevar. La ingesta de MP por parte de animales marinos está documentada y sus efectos se recogen en numerosos trabajos aunque se apunta que las concentraciones usadas en estas investigaciones pueden ser no realistas<sup>14</sup>. Los moluscos se consideran una importante ruta de exposición a microplásticos al ser animales que se alimentan por filtración y son consumidos enteros sin eliminar los intestinos, aunque lo mismo puede aplicarse a otros animales marinos filtradores<sup>7, 15, 16</sup>. Los MP pueden lixiviar aditivos en los organismos que los ingieren y servir también como transportadores de otras sustancias tóxicas, lo que supone un riesgo para la salud debido a los efectos que la bioacumulación que estas sustancias puede producir.

Los esfuerzos de la Unión Europea por atajar el problema derivado de la producción y desecho de plásticos se ven reflejados en las diferentes directivas y reglamentos que se llevan adoptando desde hace años y en las modificaciones correspondientes. Se calcula que el 95% del plástico de embalaje, con un valor de 80-120 mil millones de dólares, se pierde

anualmente<sup>2</sup>. Una de las medidas y objetivos tomados por la UE se centra en que para el año 2030 todo el plástico destinado a embalajes sea reciclable<sup>17</sup>.

A pesar de todos los esfuerzos y de las medidas puestas en marcha para reducir el problema de los MP, este no es fácil de eliminar. Se necesita conocer datos objetivos y crear conciencia en las autoridades y en la sociedad, ya que los vertidos y la ubicuidad de los MP crea no solo riesgos ecológicos, sino también socioeconómicos y de salud con visos de convertirse en uno de los mayores problemas medioambientales de este siglo.

De modo general, para poder legislar y mantener un control de los niveles de polución existentes, es importante conocer de manera precisa las concentraciones de contaminantes presentes en un determinado medio. En el caso de los microplásticos en el ambiente, existe un problema adicional que impide la regulación y legislación de los microcontaminantes, y es la falta de métodos de identificación y cuantificación fiables para ellos. Es cierto que en la bibliografía podemos encontrar una variedad de métodos tanto de muestreo como de identificación y cuantificación, dependiendo de la fuente y tipo de partícula, sin embargo, existe una gran discrepancia entre los resultados obtenidos, la cual se debe fundamentalmente a la falta de métodos estandarizados que den resultados reproducibles. Es muy común, encontrar en la bibliografía, dependiendo de la fuente consultada, que los datos de concentraciones de partículas de MP y NP varían enormemente incluso para muestras recogidas en una zona geográfica relativamente cercana. Se deduce, por tanto, que hay una gran necesidad de investigar y desarrollar nuevos métodos de análisis que sean fiables y reproducibles.

## **2. Justificación y objetivos**

Como acabamos de mencionar, existe una creciente preocupación por la ubicuidad de desperdicios plásticos a nivel mundial, especialmente en el medio marino, así como por desarrollar métodos de identificación y cuantificación de microplásticos que puedan ayudar a asentar las bases para una legislación reguladora de estos microcontaminantes.

El objetivo del presente trabajo es hacer una revisión de los métodos actuales de análisis de micro y nanoplásticos en el medioambiente y en la biota marina.

Esta preocupación ha empezado a suscitar incertidumbres sobre la ingesta de plásticos por parte de los consumidores y sus efectos en la salud. Los MP y NP son ingeridos por la mayoría de especies marinas, llegando al consumidor a través de la cadena alimentaria.

La variedad de tipos de plásticos y formas en las que los encontramos en el medioambiente genera una falta de consenso en cuando a los métodos de muestreo,

digestión, identificación y cuantificación, y hace difícil poder legislar adecuadamente para establecer límites que ayudarán a combatir el problema. Se necesita adoptar protocolos estandarizados que permitan comparar datos entre diferentes estudios.

En este trabajo se intenta profundizar en estos métodos y se hace una revisión de cuáles serían los más adecuados en cada situación, lo cual ayudaría a la hora de cuantificar mejor las concentraciones de microplásticos y nanoplásticos y a legislar pudiendo aplicar en cada caso las medidas correctivas y preventivas más adecuadas.

Por todo lo expuesto, el objetivo general de este trabajo de Fin de Máster se basa en la revisión y la descripción de los métodos actuales para la posible cuantificación de los microplásticos en el medioambiente.

Los objetivos específicos serán:

- Descripción de los tipos de los plásticos que más residuos generan en el medioambiente.
- Exposición de las fuentes de contaminación plástica en el mar y la biota marina.
- Relación de métodos de análisis para la caracterización e identificación de microplásticos.
- Descripción de los métodos de detección y cuantificación.

### **3. Tipos de plásticos**

Los plásticos son sustancias químicas sintéticas en forma de cadenas poliméricas formadas por moléculas más pequeñas denominadas monómeros. Cada familia de polímero está constituida por diferentes monómeros o una combinación de ellos. Las cadenas varían de tamaño, pero en el caso de los polímeros comerciales suelen estar en torno a los 1,000-10,000 monómeros, por lo que se denominan macromoléculas. Son materiales que aportan diferentes propiedades muy interesantes desde el punto de vista industrial, razón por la que su uso está tan generalizado<sup>18-20</sup>.

El origen de la industria plástica sintética se remonta a principios del siglo XX con la fabricación de la baquelita, un fenol de formaldehído termoestable, por L.H. Baekeland<sup>21</sup>. Durante la II Guerra Mundial la industria del plástico en EE.UU. experimentó una gran expansión debido a la aparición del Nylon y a su uso en diferentes artículos como paracaídas y cuerdas, aumentando la producción de plásticos en un 300%.<sup>22</sup>

### 3.1. Clasificación

Dependiendo del método de síntesis, podemos clasificar los polímeros en diferentes grupos. Los *polímeros de adición*<sup>21</sup> se forman rompiendo el doble enlace entre dos carbonos de un monómero, pudiéndose unir así a otras dos moléculas similares, sin la formación de subproductos. También es posible romper la unión entre un carbono y un oxígeno, o los enlaces triples carbono-nitrógeno. Estas reacciones se conocen como reacciones en cadena y precisan de una sustancia catalizadora que es la que genera la rotura del doble enlace. Un ejemplo de polímero de adición es el policloruro de vinilo (PVC)<sup>20</sup> (**Figura 1**).

En la *polimerización por condensación*<sup>20</sup> no es necesario que el monómero contenga un doble enlace, sino que se produce a partir de monómeros polifuncionales. En esta reacción se generan subproductos, como por ejemplo el agua, amoníaco o cloruro de hidrógeno, que se eliminan por condensación, de ahí el nombre de la reacción que también se conoce como polimerización por crecimiento en etapas<sup>21</sup>. Cada monómero tiene dos terminaciones que pueden reaccionar por lo que se van formando cadenas de mayor tamaño.

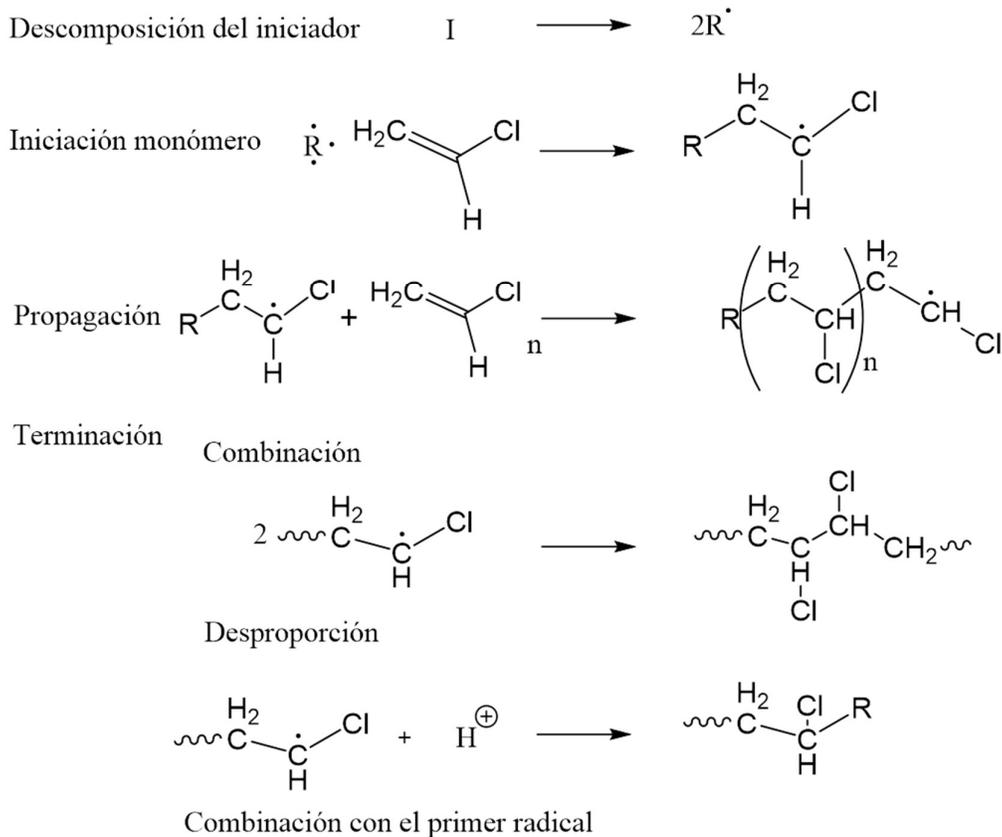


Figura 1: Mecanismo vía radicales libres de la polimerización del PVC<sup>23</sup>

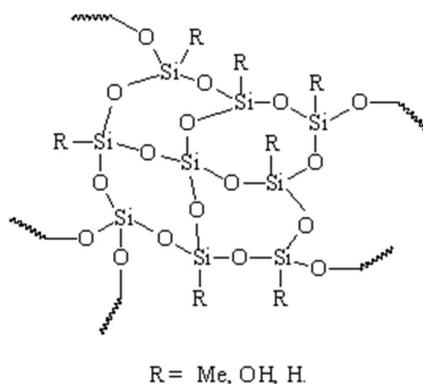
Dependiendo de su comportamiento frente al calor, los plásticos pueden dividirse entre termoplásticos o termoestables. Los *termoplásticos* son los materiales más importantes desde un punto de vista comercial. Están formados por polímeros lineales o ramificados y tienen la posibilidad de poder transformarse en líquidos al calentarse y volver a darles una forma distinta posteriormente. El inconveniente es que el número de veces que puede realizarse este proceso es limitado ya que sus propiedades físicas se ven alteradas. Este tipo de plásticos es por tanto susceptible de ser sometido a procesos de reciclado<sup>19, 20, 24</sup>. Dentro de este grupo podemos encontrar el PE, PP, PVC, PS, resina de ABS (Acrilonitrilo, Butadieno, Estireno) y Policarbonato (PC)<sup>25</sup>.

Una vez un plástico *termoestable* ha sido conformado, al ser sometido a altas temperaturas no es posible modificar su forma ya que durante el proceso de curado adquieren un estado final reticulado que los hace insolubles e incapaces de fundir, aunque algunos pueden arder<sup>21, 26</sup>. Se utilizan, por ejemplo, en la fabricación de accesorios para instalaciones eléctricas (resinas fenólicas) o como recubrimientos de materiales eléctricos (resinas epoxi)<sup>25</sup>.

Los *elastómeros* son polímeros amorfos con estructuras muy retorcidas enrolladas de manera arbitraria, capaces de estirarse y de recuperar después su forma original. El proceso de vulcanizado, descubierto por Goodyear, introduce azufre en la estructura de los elastómeros entrelazando su estructura y haciendo que no pueda ser reprocesado posteriormente. El entrecruzamiento actúa impidiendo el deslizamiento mutuo de las cadenas unidas. Los elastómeros presentan propiedades como la tenacidad y buena flexibilidad a bajas temperaturas, aunque requieren de un procesado lento. El caucho es el elastómero más utilizado a nivel mundial, aunque el más importante es el SBR (Styrene-Butadiene Rubber, Goma de Estireno Butadieno), que se utiliza reforzado con negro de humo para la fabricación de neumáticos en la industria automovilística<sup>21, 27</sup>.

Las siliconas son también elastómeros. En su estructura, ciertos átomos de carbono se han sustituido por átomos de silicio y oxígeno (**Figura 2**). Las siliconas conservan su elasticidad incluso a temperaturas cercanas a los -90°C y son estables hasta los 315°C. Son resistentes a la degradación ambiental y a los aceites lubricantes y pueden ser vulcanizadas a temperatura ambiente<sup>21, 27</sup>.

La utilización de *aditivos* permite cambiar las propiedades de los polímeros. Los aditivos se introducen en la matriz polimérica sin afectar a la estructura molecular del polímero<sup>26</sup>. En la **Tabla 1** se muestran algunos de los principales aditivos y sus efectos.



**Figura 2: Estructura química de los polímeros de silicona** <sup>28</sup>

Teniendo en cuenta que una gran cantidad de plásticos derivan del petróleo, que es un material no renovable, cualquier método de síntesis que utilice otras fuentes para su producción es interesante. En esta línea, científicos de la Universidad de Wisconsin-Madison acaban de publicar un artículo en el que se ha logrado producir PDC (ácido 2-pirona-4,6-dicarboxílico), un precursor del poliéster, a partir de microbios. Pérez et al.<sup>29</sup> emplean el *Novosphingobium aromaticivorans* cancelando parte de sus genes para convertir compuestos aromáticos derivados de plantas en PDC u otros plásticos de consumo.

La lignina, que es un derivado sin apenas valor de la industria del papel, y una fuente muy importante de compuestos aromáticos, puede con este mecanismo romperse en compuestos precursores de bioplásticos y adhesivos epoxi. Además, *N. aromaticivorans* puede metabolizar compuestos aromáticos simultáneamente usando otras fuentes de carbón orgánico como la glucosa, dando lugar a la excreción de compuestos derivados de la metabolización incompleta de los aromáticos.

**Tabla 1: Aditivos y sus efectos en los polímeros (Beltrán Rico, 2012<sup>26, 30</sup>)**

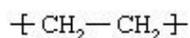
Aditivos	Efectos	Ejemplos
<b>Cargas</b>	Abaratan. Mejoran las propiedades	Amianto, mica, yeso, serrín, fibra corta
<b>Rellenos</b>	Mejoran las propiedades mecánicas (resistencia, rigidez, impacto)	Fibra de vidrio, de carbono; fibra larga
<b>Ignifugantes</b>	Reducen la combustibilidad.	Hidróxido de aluminio, productos bromados
<b>Plastificantes</b>	Aumentan la plasticidad.	Ftalato de dioctilo, ésteres
<b>Estabilizantes</b>	Retrasan el envejecimiento.	Poliéster
<b>Aditivos conductores</b>	Evitan la carga estática	Negro de humo, microfibras de acero, de carbono
<b>Colorantes y pigmentos</b>	Proporcionan un color definido	Óxido de titanio, negro de humo, óxidos de hierro, ftalocianina, rodamina, quinacridona

<b>Lubricantes</b>	Facilitan el moldeo	Ácido esteárico, estearato cálcico, palmitato de etilo, cera de Montana, ácido oléico
<b>Aceleradores / Inhibidores</b>	Activan o retardan la polimerización	Estereato
<b>Agentes espumantes</b>	Proporcionan espumados	polímeros Pentano, heptano, cloruro de metileno

A continuación, se describen alguno de los tipos de plásticos más utilizados que contribuyen a la formación de micro y nanoplásticos en el ambiente.

### **3.2. Polietileno PE**

El polietileno (**Figura 3**) es una resina poliolefina resultado de la polimerización del etileno. Se sintetizó por primera vez a principios de los años 30 del siglo XX y es el plástico más utilizado en el mundo, con el que se fabrican gran variedad de productos de uso común como botellas o envoltorios para alimentos, pero que también puede formar parte de fibras sintéticas o ser modificado y adquirir propiedades elásticas<sup>31</sup>.



*Figura 3: Monómero de etileno*<sup>31</sup>

Es un material con un bajo coste de fabricación, fácil de procesar y que no reacciona químicamente con los productos que se ponen en contacto con él. Las diferencias de presión influyen especialmente durante el proceso de elaboración, alterando la ramificación de la cadena y el grado de cristalinidad.

Existen diferentes grados de densidad, como el LDPE (Low Density Polyethylene, Figura 4) y el HDPE (High Density Polyethylene, Figura 5), o polietileno de baja y alta densidad, respectivamente.



*Figura 4: LDPE*<sup>32</sup>



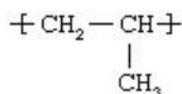
*Figura 5: HDPE*<sup>33</sup>

El LDPE es un polímero altamente ramificado de baja densidad y cristalinidad. Se fabrica a partir de etileno gaseoso a muy altas presiones y temperaturas, en presencia de iniciadores de peróxido. Presenta una estructura amorfa en la que algunos de los carbonos tienen asociadas largas cadenas de polietileno en lugar de hidrógenos. Es un material muy flexible, con una gran resistencia química y dieléctrica, resistente a las bajas temperaturas y no tóxico. Se puede transformar por inyección, soplado, extrusión o rotomoldeo lo que lo convierte en un material muy versátil. Tiene unos costes de fabricación bajos y el procesado es sencillo. Se utiliza en bolsas, embalajes, películas y aislamiento para cables.

El HDPE se fabrica a bajas presiones y temperaturas usando catalizadores de Ziegler-Natta y metalloceno u óxido de cromo activado. Tiene una temperatura de fusión más alta y presenta una mayor rigidez y resistencia que el LDPE gracias a su estructura lineal con mayor cristalinidad y densidad. Se emplea en la fabricación de botellas y artículos de uso doméstico ya que es irrompible, impermeable y no tóxico<sup>31, 34, 35</sup>.

### **3.3. Polipropileno PP**

El polipropileno (**Figura 6**) es uno de los termoplásticos más utilizado desde su introducción en 1950. Es el resultado de la polimerización del propileno y también podemos encontrarlo en diferentes grados de densidad.



*Figura 6: Monómero de polipropileno* <sup>36</sup>

Su forma isotáctica, en la que todos los grupos metilo se ordenan en el mismo lado de la cadena, es la más comercializada. Para su fabricación se utilizan catalizadores Ziegler-Natta a bajas presiones y temperaturas.

Es uno de los plásticos más ligeros y sus costes de fabricación son bajos. Se puede transformar fácilmente y es inodoro, insípido y fisiológicamente inocuo. Ofrece muy buenas propiedades térmicas y mecánicas y buena resistencia al impacto. Resiste bien las flexiones repetidas, aunque no la intemperie y la oxidación a temperatura, y se quema desprendiendo humos y goteando.

Soporta bien las temperaturas cercanas a los 100°C, por lo que puede utilizarse para tuberías y objetos que necesiten esterilizarse. Otros usos son la fabricación de moquetas, cuerdas y pañales desechables<sup>30, 31, 35</sup>.

La figura 7 muestra algunos de los ejemplos de la utilización de este material.

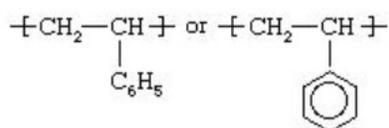


**Figura 7: Material de polipropileno empleado en vasos (a), fundas (b), cuerdas (c) y pañales desechables (d)**<sup>37-40</sup>

### 3.4. **Poliestireno PS**

El poliestireno es un homopolímero sintético de cadena lineal amorfa, con un grupo fenilo unido cada dos átomos de carbono (**Figura 8**). Los anillos de benceno evitan que las cadenas se empaqueten en ordenamientos cristalinos, por lo que el poliestireno es un material transparente. Además, los anillos de benceno evitan la rotación de las cadenas alrededor del enlace carbono-carbono, proporcionando al material de rigidez.

En su fabricación se utilizan como materias primas el benceno y el etileno, que reaccionan en presencia de cloruro de aluminio para dar etilbenceno, el cual es deshidrogenado produciendo estireno que se polimeriza posteriormente.

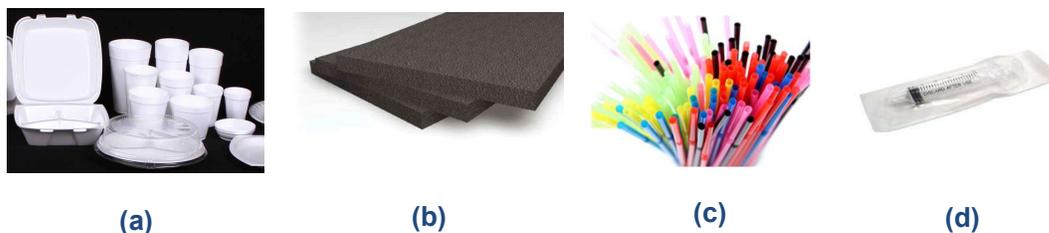


**Figura 8: Monómeros de estireno**<sup>41</sup>

Es un termoplástico que se ablanda cuando es sometido a calor debido a su baja temperatura de fusión por lo que es fácilmente moldeable, pero su estructura amorfa lo convierte en un material frágil. Al ser transparente se puede colorear fácilmente y también puede disolverse en varios solventes.

El poliestireno de alto impacto (HIPS) contiene entre un 5-10% de hule para contrarrestar su fragilidad. Esto consigue una mejora de su tenacidad, pero reduce la transparencia y su resistencia a la tensión.

El poliestireno puede utilizarse para la fabricación de envases y utensilios desechables para comida, aislantes térmicos y acústicos, juguetes, materiales de construcción y para instrumental médico desechable<sup>34, 35, 41</sup>, tal y como se muestra en la **Figura 9**.

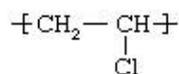


**Figura 9:** Material de poliestireno empleado en envases desechables (a), aislantes termoacústicos (b), pajitas (c) e instrumental médico desechable (d)<sup>42-45</sup>

### **3.5. Policloruro de vinilo PVC**

Su estructura se muestra en la **figura 10**. Es similar a la del polietileno, pero alternando un cloruro cada dos átomos de carbono. Fue uno de los primeros plásticos descubiertos y también uno de los más empleados<sup>35, 46</sup>.

Es un producto formado principalmente por sal común (57%) y gas o petróleo (43%)<sup>35</sup>. La electrólisis del agua da lugar al cloro y el etileno puede derivarse de la nafta, cuando se refina el petróleo, o a partir de gas natural. El cloro y el etileno se combinan para dar lugar al monómero cloruro de vinilo<sup>47</sup>.



**Figura 10:** Monómero de cloruro de vinilo<sup>46</sup>

El cloruro de vinilo está considerado un gas carcinogénico que debe manipularse con cuidado<sup>47</sup>.

El PVC ofrece una amplia gama de aplicaciones debido a sus propiedades, bajo coste y resistencia al agua y al fuego. Se pueden añadir aditivos para convertirlo en rígido o flexible<sup>21</sup>. En la **Figura 11** se muestran algunos ejemplos de utilidad común fabricados con este material.



Figura 11: Material de PVC empleado en tuberías (a), mangueras (b) y marcos para ventanas (c) <sup>48-50</sup>

### 3.6. Polietileno Tereftalato PET

El PET es un poliéster saturado lineal (**Figura 12**). Se produce por la polimerización del etilenglicol y del ácido tereftálico. Los anillos de benceno presentes en la cadena proporcionan al polímero buenas propiedades de dureza y firmeza. En estado amorfo es transparente y en estado semicristalino, opaco<sup>30, 51</sup>. Estas configuraciones dependerán de la velocidad de enfriamiento después del conformado<sup>34</sup>.

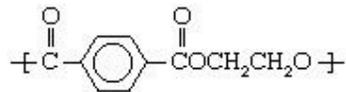


Figura 12: Monómero de PET<sup>51</sup>

En su estado semicristalino ofrece una elevada dureza, rigidez y resistencia a la abrasión, pero una mediana resistencia mecánica, baja tenacidad y alta sensibilidad a la entalla. No resiste el agua caliente por encima de 80°C y sus propiedades eléctricas son moderadas. La baja fluidez dificulta su moldeo por inyección aunque los costes de producción son bajos<sup>30</sup>. Las fibras de PET se pueden utilizar para muebles o mezcladas con algodón y lana<sup>34</sup> (**Figura 13**).



Figura 13: Material de PET empleado en fibras de relleno (a) y botellas (b) <sup>52, 53</sup>

En estado amorfo se utiliza principalmente para la fabricación de botellas y envases de un solo uso. Presenta una rigidez inferior a la del cristalino y una temperatura de uso inferior a los 60°C<sup>30</sup>.

#### **4. Definición de micro y nanoplásticos, composición y perspectiva actual**

Consideramos plásticos a los polímeros a los que se les añaden aditivos para modificar sus propiedades físicas. Los residuos plásticos serán los objetos plásticos abandonados en el medioambiente<sup>4</sup>.

Existen diferentes definiciones para microplásticos con diferentes límites de tamaños para las partículas, pero en este trabajo se ha adoptado la propuesta por Arthur et al.<sup>3</sup> en la que se definen los *microplásticos* como partículas plásticas de tamaño inferior a 5 mm y en un rango de tamaños que abarca hasta los 333µm<sup>3</sup>. Esta definición pretende centrarse más en los efectos toxicológicos y no en los efectos físicos que la ingesta de microplásticos podría ejercer en la fauna marina.

Frias et al.<sup>5</sup> proponen la siguiente definición: “Los microplásticos son cualquier partícula sólida sintética o matriz polimérica, de forma regular o irregular, y con tamaños comprendidos entre 1 µm y 5 mm, de origen primario o secundario en cuanto a su manufactura, y que es insoluble en agua”.

Gigault et al.<sup>4</sup> definen *nanoplásticos* como partículas individuales y/o en formas homo o heteroagregadas de tamaños comprendidos entre 1nm y 1 µm. Son partículas que resultan de la degradación de objetos plásticos y pueden demostrar un comportamiento coloidal. Se excluye de esta definición a los nanomateriales manufacturados presentes en productos de uso común.

##### **4.1. Fuentes de contaminación plástica en el mar**

Se consideran fuentes de contaminación primarias aquellas en las que los microplásticos se producen intencionadamente para su uso directo o como precursores de otros productos, y llegan al mar procedentes de las escorrentías de aguas interiores<sup>3, 54</sup> o de aguas procedentes de plantas de tratamiento<sup>55</sup>.

Las fuentes secundarias serían aquellos microplásticos que se forman en el medioambiente como consecuencia de la degradación de otros materiales plásticos más grandes. Esto dependerá de las características del polímero, de las condiciones ambientales en las que se encuentre y de su grado de degradación<sup>3</sup>. Por tipos, el PP es el plástico que

alcanza tamaños más pequeños , seguido de PE y PS, lo que sugiere que estos plásticos presentan diferentes comportamientos frente a los factores de degradación<sup>56</sup>.

La forma de las partículas también influirá en su proceso de degradación. Aunque la degradación química puede originarse en el mar, los procesos mecánicos producen fracturas y marcas que originan sitios en los que pueden generarse procesos oxidativos. Las partículas con bordes afilados pueden indicar la rotura reciente a partir de una pieza mayor o un menor tiempo de residencia en el mar. Aquellas con tamaños mayores presentan formas más elongadas y con superficies más irregulares, mientras que las más pequeñas suelen tener formas más redondeadas<sup>57</sup>. Las partículas que presenten descascarillados son más proclives a alojar otras partículas en su interior, acelerando su proceso de degradación. Los aditivos como colorantes, rellenos o estabilizantes también contribuyen a que la degradación se inicie o se acelere, generando sitios de ataque<sup>58</sup>. No se dispone de datos para poder predecir la velocidad de producción de estos microplásticos secundarios.

Debemos entender la degradación como cualquier cambio químico que reduce drásticamente el peso molecular medio de un polímero. Si el material sufre un proceso de degradación, sus propiedades mecánicas se van a ver reducidas. En el medioambiente<sup>54</sup>, dependiendo del agente de acción, podemos clasificar la degradación en:

- a) Biodegradación: debido a la acción de organismos vivos como microbios;
- b) Fotodegradación: debido a la acción de la luz solar en materiales que normalmente se encuentran a la intemperie;
- c) Degradación termooxidativa: se da lugar a temperaturas dentro de un rango moderado produciendo una rotura oxidativa lenta;
- d) Hidrólisis: debido a la acción del agua.

En el medioambiente marino, el agente de degradación más predominante es la luz UV-B, que es la causante de los procesos fotooxidativos, seguida de procesos termooxidativos. La biodegradación y los procesos de hidrólisis son procesos menores en comparación con la fotodegradación.

Según Andrady<sup>54</sup>, es en las playas donde mayor cantidad de microplásticos se generan. Los materiales plásticos que se encuentran flotando en el mar o que se hunden bajo la superficie ven reducida su fotodegradación en comparación con los mismos materiales encontrados en la superficie en la arena de la playa. La causa principal es la disminución de la temperatura y la concentración de oxígeno, lo que disminuye la velocidad de reacción, la cual se ve aún más afectada si el material es colonizado por algas u otros organismos que impiden su foto oxidación.

Asimismo, a no ser que nos encontremos con biopolímeros, los plásticos no se suelen biodegradar en el mar ya que no existe una gran variedad de especies microbianas capaces de metabolizarlos. Tampoco se dan procesos de mineralización ya que las condiciones no son óptimas.

En las playas, (**Figura 14**) los plásticos que se encuentran tirados en la arena pueden alcanzar temperaturas superiores a 40°C al ser expuestos a la luz solar, incrementándose aún más si los plásticos son opacos o de color oscuro. Los fragmentos de plásticos que no contienen estabilizantes UV sufren mayor degradación oxidativa. Estas condiciones dan lugar a superficies frágiles con microroturas, susceptibles de romperse fácilmente por la acción de cambios en la humedad o la temperatura o por abrasión con la arena, dando lugar a microplásticos<sup>54</sup>. La limpieza de playas se presenta por tanto como una medida más que necesaria para atajar el problema de la proliferación de microplásticos en el mar.

En muchos estudios, el mayor porcentaje de microplásticos encontrados son fibras, de las cuales la mayoría están compuestas de poliéster y poliamida<sup>59-63</sup>. El lavado de prendas textiles es una fuente importante de fibras de MP, problema que, con gran seguridad, aumentará en el futuro al aumentar también la población<sup>64, 65</sup>. Una sola prenda de ropa fabricada con materiales sintéticos es capaz de generar hasta 2 g de microfibras por ciclo de lavado, o el equivalente al 0.3% de su peso<sup>66</sup>. Los textiles no solo son fuente de generación de MP, sino que también actúan como transportadores de los mismos<sup>67</sup>. Estas fibras llegan hasta el mar a través de los vertidos de las plantas de tratamientos de aguas. Otras causas de formación de fibras es la degradación de cuerdas y aparejos de pesca, atribuyéndose el 18% de la basura plástica encontrada en el mar a la industria pesquera<sup>54, 60</sup>.



*Figura 14: Restos de plástico en Jumeirah Beach (Dubai, EAU), marzo 2019.*

Gran parte del plástico que acaba en el mar procede de zonas terrestres y llega hasta los océanos transportado por las aguas fluviales<sup>65</sup>, estimándose estas cantidades entre 1.15 y 2.41 millones de toneladas<sup>68</sup> (**Figura 15**). Más del 90% de los vertidos plásticos son arrastrados por solo 122 ríos, que se encuentran mayoritariamente en Asia, vertiendo un 67% de la tasa global, aunque solo representan el 36% de la población mundial. Los vertidos son estacionales coincidiendo sus picos con los meses de monzón<sup>69</sup>. Los sedimentos acaban siendo el sumidero de plásticos y microplásticos en el medio marino y en los estuarios de los ríos<sup>65, 70</sup>.



*Figura 15: Residuos plásticos en Myanmar, septiembre 2016* <sup>68</sup>

Además de las rutas comentadas hasta ahora, no hay que descartar que la degradación de plásticos destinados al envase de alimentos sea una fuente importante de microplásticos que llegan hasta el consumidor. En el estudio realizado por Schymanski et al.<sup>71</sup> se encuentran partículas de MP de hasta 1  $\mu\text{m}$  en todas las muestras de agua procedentes de botellas reutilizables, de un solo uso o de tetrapacks.

#### **4.2. Comportamiento de partículas plásticas en el mar**

La contaminación costera por microplásticos es un problema global, incrementándose en las zonas mayormente pobladas o con pobres sistemas de eliminación de residuos. Partículas de todos los tamaños tienden a converger en zonas subtropicales, donde la densidad de población es menor pero las corrientes atrapan estas partículas<sup>13</sup>.

Aunque los vertidos de plásticos en el hemisferio norte son superiores a los del sur, debido a la mayor densidad de población, la acumulación de plásticos en las zonas australes es muy similar. Esto puede ser debido a su redistribución por las corrientes marinas o a fuentes de vertidos que no se han contabilizado como, por ejemplo, las corrientes procedentes de la Bahía de Bengala que cruzan el Ecuador en dirección Sur hacia Indonesia.

Otra posibilidad es que cantidades de plásticos mayores a las consideradas anteriormente se pierdan de la superficie marina por hundimiento y degradación, dando lugar a una desproporción en el hemisferio norte. Otros procesos hidrodinámicos pueden alterar la distribución de flotabilidad de los plásticos, influyendo en las cantidades encontradas<sup>13</sup>. La ingestión por parte de animales también contribuye a su eliminación de la superficie marina, así como su rotura en fragmentos de tamaño inferiores a los que pueden recoger las redes de muestreo.

Dependiendo del tamaño de partícula y de su densidad, los plásticos podrán sedimentar o flotar en el agua del mar. La flotabilidad es función del volumen y la densidad de las piezas, por lo que, dependiendo de estas características, los objetos permanecerán durante tiempos variables a diferentes estratos. La flotabilidad y, por tanto, la concentración de los microplásticos, disminuye con la profundidad de manera exponencial, existiendo un mayor descenso en mares con poco movimiento, sobre todo para las partículas de mayor tamaño<sup>4, 72</sup>.

El tamaño y la flotabilidad determinan la dispersión de los residuos flotantes. Ryan et al. en su estudio de 2015<sup>73</sup> prueban que el tamaño de los residuos aumenta conforme lo hace su distancia a la fuente de contaminación. Además, los objetos más pequeños se rompen más rápidamente y acaban siendo menos visibles en el mar.

La colonización de partículas de microplásticos por parte de algas o microorganismos aumenta el peso de estas partículas cambiando sus propiedades de flotabilidad, haciendo que se hundan más rápidamente que partículas de un tamaño superior. Esta puede ser la causa por la que parece “faltar” plástico en los océanos tal y como apuntan varios autores<sup>13, 74 75</sup>.

Los nanoplásticos son también capaces de asociarse directamente con coloides orgánicos e inorgánicos disueltos para formar agregados estables e inestables en las condiciones dadas de su medio de dispersión<sup>4</sup>. Se entiende por coloide cualquier partícula con dimensiones de entre 1 nm y 1  $\mu\text{m}$  <sup>76</sup>.

### **4.3. Efectos de los microplásticos en la biota marina**

Los micro y nanoplásticos pueden pasar a la biota marina por medio de diferentes rutas. Dependiendo de su modo de alimentación, los animales pueden ser consumidores directos, ingiriendo los microplásticos directamente de sedimentos o de partículas en suspensión, o en el caso de depredadores o carroñeros, a través de sus presas. El tamaño del microplástico es determinante en el efecto que produce sobre la biota marina. Si el MP tiene un tamaño superior a 50  $\mu\text{m}$  no será capaz de atravesar la barrera intestinal del animal marino. Por el contrario, tamaños inferiores a 50  $\mu\text{m}$  son capaces de atravesar el epitelio intestinal<sup>77</sup>. En principio, al no existir rutas enzimáticas capaces de digerir los polímeros sintéticos, estos deberían pasar a través del organismo sin ser digeridos o absorbidos. Sin embargo, se observa que animales expuestos a una alimentación que contiene nanoplásticos son capaces de pasar estos a sus crías<sup>78</sup>. La transferencia de estos NP entre generaciones tiene graves implicaciones tanto medioambientales como para la salud humana.

A grandes rasgos, existen tres posibles efectos, ligados a la ingestión de microplásticos:

- 1) La obstrucción física o el daño de los apéndices de alimentación o del tracto digestivo;
- 2) La filtración o lixiviación de componentes químicos en los organismos tras la digestión,  
y
- 3) La ingestión y la acumulación de compuestos químicos absorbidos por el organismo<sup>3</sup>.

Las fibras son la categoría más abundante de residuos encontradas en la biota<sup>60, 62, 63</sup>, especialmente en zonas cercanas a la costa. Al analizar los colores de partículas más encontradas en el sistema gastrointestinal de peces los más abundantes son azul, transparente y negro<sup>60, 79</sup>. Es posible que estas partículas pasen desapercibidas a la vista de los peces y sean ingeridas por este motivo o sean confundidas con presas o alimento.

Existen numerosos estudios en los que se refleja el contenido y los métodos utilizados para la detección de MP en animales marinos, especialmente aquellos destinados al consumo humano. Dependiendo de la tasa de evacuación intestinal, las diferentes especies tendrán concentraciones de plástico variables<sup>79, 80</sup>. Un mújol puede llegar a ingerir unas 11.000 partículas de plástico en un año, mientras que un besugo que habita en las mismas aguas solo ingiera 600<sup>81</sup>, debido a que el primero tiene una tasa de evacuación de entre 12 y 24 horas, mientras que el del segundo es de entre 2 y 6 horas.

Las diferentes zonas geográficas de muestreo de las especies también influyen en las cantidades de plástico encontradas. En las costas asiáticas y australes, la cantidad de plástico encontrada es significativamente mayor que en el mar del Norte<sup>15, 63, 80-82</sup>. En Corea del Sur,

el 95% de las especies de moluscos más vendidas (almeja de Manila, ostra, mejillón y vieira), contienen microplásticos<sup>15</sup>.

Los bivalvos se utilizan a menudo como modelos medioambientales en medios marinos al ser especies filtradoras. Análisis realizados en moluscos revelan que la cantidad de microplásticos detectadas en estos varían dependiendo de la zona en la que estos hayan sido cultivados o recolectados, siendo los mejillones y ostras los que mayor acumulación presentan. Esto puede ser debido a que los microplásticos se acumulan mayoritariamente en la superficie, siendo las especies que crecen en estas zonas las que más filtran y acumulan a lo largo de su vida<sup>7, 15</sup>. Los bivalvos de piscifactoría también presentan mayor cantidad de MP que los salvajes (1.9 partículas por individuo vs. 0.53)<sup>63</sup>. Hay que tener en cuenta que, por ejemplo, los mejillones de piscifactoría se cultivan en cuerdas de plástico de PP, lo que puede aumentar la cantidad de partículas de MP en su medio.

Varios estudios<sup>15, 83</sup> identifican no solo MP en las muestras de bivalvos, sino que también se han identificado otros tipos de aditivos plásticos que se utilizan en la formación de polímeros comerciales comunes, como el Bisphenol-A, nonilfenoles y ftalatos (contenidos en PVC), los cuales pueden actuar como disruptores endocrinos aumentando la formación de micronúcleos y otras anomalías celulares en mejillones.

Los gusanos marinos (*Arenicola marina*) experimentan un descenso de hasta el 50% en sus reservas de energía si habitan en sedimentos que contienen fragmentos microscópicos de PVC sin plastificar de acuerdo al trabajo realizado por Wright et al.<sup>84</sup>. Este estudio sugiere que la causa puede ser debida a una disminución de la actividad de alimentación, a los mayores tiempos de residencia que presenta el material ingerido y a una inflamación del aparato digestivo. Una de las funciones que desempeñan estos gusanos como consecuencia de su actividad alimentaria es la oxigenar los sedimentos en los que habitan. Si esta oxigenación se ve reducida esto también repercute en la diversidad de los organismos que habitan en los fondos sedimentarios.

Para especies como las sardinas, brechas y salmonetes<sup>85</sup>, las cantidades de microplásticos encontradas son bastante similares, incluso comparadas con otras especies como los mejillones. La diferencia entre estos últimos y los primeros es que, en el caso de los peces, los órganos estudiados (intestinos, estómago, glándulas digestivas) no son consumidos normalmente, mientras que, en el caso de los mejillones, estos sí son ingeridos en su totalidad por el consumidor<sup>63</sup>. Sin embargo, el consumo de intestinos de pescado es práctica común en determinadas zonas del planeta, convirtiéndose en ruta de entrada para los desechos plásticos en la alimentación humana, lo que puede generar riesgos para la salud<sup>86</sup>. Son preocupantes las observaciones en las que se detalla que los MP alcanzan el

hígado de los peces<sup>87</sup> debido a la aglomeración de partículas más pequeñas que hayan conseguido atravesar la barrera intestinal. De este modo los MP podrían así alcanzar el sistema circulatorio, por lo que sus contaminantes podrían transferirse a los diferentes órganos.

Grandes especies filtradoras como el rorcual común y el tiburón peregrino podrían utilizarse como especies indicadoras de la zona pelágica del Mediterráneo de acuerdo con la MSFD (Marine Strategy Framework Directive). Fossi et al.<sup>16</sup> encuentran ftalatos y organoclorados en el músculo de ambas especies, lo que sugiere la ingesta de MP y la exposición crónica a sus aditivos. Se calcula que un tiburón peregrino puede ingerir del orden de 540 partículas de MP por hora y el rorcual común alrededor de 3650 partículas por día.

#### **4.4. Toxicidad de los microplásticos**

Los factores relacionados con la toxicidad de los plásticos ingeridos se pueden resumir en los siguientes puntos:

- a) Los plásticos ingeridos pueden contener monómeros residuales de la manufactura o aditivos tóxicos que pueden filtrarse al organismo que los ingiere;
- b) La toxicidad derivada de los productos intermedios de la degradación parcial de los plásticos;
- c) Los microplásticos pueden ser el soporte de adsorción de pesticidas o de contaminantes orgánicos persistentes (COP) tales como bifenilos policlorados (PCBs), hidrocarburos policíclicos aromáticos (PAHs) y éteres difenil polibrominados (PBDEs), etc., existentes en el agua, los cuales se pueden adsorber y concentrar lentamente en la superficie del fragmento de microplástico, eliminándolos del agua pero pasando al organismo que los ingiere<sup>54</sup>.

Los ácidos grasos que se encuentran de manera natural en el estómago de los peces sirven como disolventes naturales, siendo capaces de disolver los residuos de polímeros ingeridos, pudiendo dar lugar a la ruta para la incorporación de COPs en los tejidos de estos<sup>88</sup>. La posibilidad de que los MP filtren tóxicos a los organismos que los ingieren es estudiada por Browne et al.<sup>89</sup>, demostrando que el nonilfenol y el fenantreno se desorben del PVC (polivinilcloruro) y que aditivos comunes en el plástico como PBDR-47 y el triclosán son transferidos a los tejidos de lombrices de tierra, acumulándose en los intestinos y afectando a su alimentación.

Los MP potencian los efectos adversos de contaminantes halogenados<sup>90</sup>. Las partículas de MP ingeridas sirven como ayudantes en la absorción de otros contaminantes que acaban

bioacumulándose en los tejidos de los animales que los ingieren y afectando a la función hepática y a la distribución de lípidos. Rochman et al.<sup>91</sup> confirman que los disruptores endocrinos como bifenilos policlorados (PCBs), PAHs y PBDEs provocan cambios en el sistema endocrino de los animales marinos. En este trabajo, la dieta de los peces bajo estudio (*oryzias latipes*, pez-arroz japonés o medaka común) se alteró cambiando un 10% en peso de la misma por polietileno conteniendo los disruptores endocrinos, frente a otros dos grupos de control en los que no se introducía plástico o solo se introducía un 10% de PE sin disruptores. Después de dos meses se observó una proliferación anormal de las células germinales de los especímenes macho.

Dos estudios realizados por Pitt et al., ambos de 2018, tratan sobre los efectos de la exposición a PS del pez cebra (*Danio rerio*). En el primero<sup>92</sup> se utilizan nanopartículas de PS fluorescente a concentraciones de 0.1, 1 y 10 ppm para estudiar su toxicidad en embriones y larvas, observándose que, tan solo 24 horas después de la fertilización, ya existe acumulación en el saco embrionario y que estas partículas migran posteriormente a lo largo de su desarrollo al tracto gastrointestinal, la vesícula, el hígado, el páncreas, el corazón y el cerebro. Aunque se observa un descenso del ritmo cardíaco y de la actividad locomotora, los individuos expuestos no se vieron afectados por mayores índices de mortalidad, deformidades o cambios en el consumo de oxígeno mitocondrial que los del grupo de control. Este estudio demuestra que incluso a niveles de ppb, los nanoplásticos son capaces de penetrar en los embriones y causar toxicidad en los órganos.

En el segundo estudio<sup>78</sup> se demuestra como la exposición a nanoplásticos de poliestireno hace que estas partículas se transfieran de madres a crías modificando el sistema antioxidante de ejemplares adultos y de larvas de primera generación. Aunque el PS es capaz de bioacumularse y de transferirse a las crías, este no da lugar a problemas fisiológicos graves. Los animales fueron expuestos a una dieta en la que se les administraba 1 mg de NPs de PS por gramo de animal. El experimento se realizó con un grupo de control en el que ninguno de los individuos era sometido a dieta con NP, un segundo grupo en el que las hembras eran las expuestas, un tercer grupo en el que los machos eran expuestos y un cuarto grupo en el que ambos progenitores eran expuestos a esta dieta durante una semana. El ritmo de fertilización no se vio afectado y la presencia de NP se pudo observar en los embriones a las 24 horas de la fertilización, con una distribución y acumulación similar a los resultados obtenidos en el estudio anterior<sup>92</sup>, pero solo en los individuos nacidos de madres expuestas o de ambos progenitores expuestos a la dieta de NP, lo que sugiere que los NP se transfieren por vía materna. Es probable que esto se deba a las interacciones de los NP de PS con las proteínas del plasma relacionadas con los ovocitos, lo cual facilitaría su transporte a los gametos. Está demostrado que el 100% de los individuos nacidos de ambos progenitores

expuestos no presentaban una vejiga natatoria funcional tras 144 horas tras fecundación. Este órgano no solo proporciona al pez de estabilidad y orientación, sino que puede afectar a su eficiencia a la hora de alimentarse y al desarrollo de una curvatura espinal en las larvas. La actividad locomotora no se vio afectada, al contrario de lo que sucedía en el estudio anterior<sup>92</sup>, lo que puede ser debido a la cantidad de NP ingeridos. Tanto en los adultos como en las larvas, se observó bradicardia y una modulación del sistema antioxidante causada por los NP de PS, disminuyendo la actividad de la enzima glutatióna reductasa y los niveles de tiol.

Además, pueden producirse procesos fisiológicos deficientes debidos a sustancias químicas que puedan ser adsorbidas por los nanoplásticos y transferirse a través de la cadena alimentaria o de madres a crías.

Los NP resultan también más perjudiciales que los MP en la fertilización y embriogénesis de las ostras (*Crassostrea gigas*) teniendo efectos perniciosos tanto en la viabilidad de las crías como en la tasa de fertilización y reproducción, ya que pueden actuar como disruptores endocrinos<sup>93</sup>.

Para contribuir a la problemática actual relacionada con el abuso de antibióticos y la resistencia bacteriana, el estudio de Zhang et al.<sup>94</sup> concluye que la oxitetraciclina, antibiótico de amplio espectro, ve favorecida su adsorción sobre partículas de esponja de poliestireno meteorizadas. El mecanismo de sorción se ve favorecido por el ácido húmico, que actúa como puente entre la superficie de la esponja y las moléculas de oxitetraciclina, y por los cambios de pH, lo que implica que la afinidad por la sorción puede variar por los cambios ambientales. Los residuos de espuma de PS también presentan un mayor rango de adsorción de mercurio que muestras vírgenes de espuma, suelos o arena. Las espumas, por tanto, pueden actuar como transportadores de tóxicos desde las aguas interiores al mar.

#### **4.5. Toxicidad de los microplásticos en humanos**

En 2016, la EFSA, la Agencia Europea de Seguridad Alimentaria, puso el foco sobre los microplásticos y nanoplásticos al considerarlos un riesgo potencial emergente. Uno de los principales inconvenientes en la evaluación de los riesgos que los MP y NP presentan para la salud humana es la falta de estudios que aborden los potenciales efectos en la salud de los MP y NP ingeridos. La exposición a MP por parte de los humanos se debe, principalmente, al consumo de moluscos y crustáceos ingeridos en su totalidad y otros productos de consumo habitual como la cerveza, el agua, la sal de mesa o la miel, pero también a la utilización de productos y materiales plásticos que pueden, por ejemplo, degradarse en microfibras y ser transportadas por el aire. Se conocen los efectos que los aditivos o las sustancias químicas

que componen los plásticos producen en el ser humano, pero no los de los microplásticos como partículas. Tampoco se dispone de datos sobre cómo el procesado puede influir en la concentración de MP o NP en un alimento en particular. La EFSA concluye en este informe que el consumo de productos pesqueros tiene, sin embargo, un escaso efecto en la exposición total de los consumidores a los aditivos plásticos y contaminantes<sup>95-97</sup>.

Tampoco hay estudios que detallen los efectos de los MP en el tracto gastrointestinal y en la microbiota humana, por lo que carecemos de datos para evaluar sus efectos sobre la salud de las personas. El tamaño de los NP les permite pasar a través de las paredes celulares pasando del tracto gastrointestinal al torrente sanguíneo y a otros órganos del cuerpo, cuyas consecuencias en la salud humana son aún desconocidas<sup>95</sup>.

Aunque las evidencias sobre sus efectos aún son limitadas, la ECHA (European Chemicals Agency, Agencia Europea de Productos Químicos) proponía a principios de 2019 la restricción de partículas de microplásticos añadidos de forma deliberada a mezclas utilizadas por consumidores o profesionales, esperando con ello reducir las emisiones de microplásticos en 400.000 toneladas en los próximos 20 años<sup>98</sup>. ECHA establece que la concentración de estas partículas en los lodos de depuradoras, que posteriormente se utilizan como fertilizantes, causa la acumulación de las mismas en el medio terrestre y acuático, pudiendo pasar a la cadena alimentaria.

La toxicidad de los aditivos utilizados en los plásticos está ampliamente estudiada. Existe una preocupación creciente en torno a los disruptores endocrinos como los ftalatos, el Bisfenol-A y los éteres difenil polibrominados, que se han relacionado con enfermedades en estudios de laboratorio y que se han encontrado en muestras medioambientales y de alimentos<sup>99</sup>. La OMS (Organización Mundial de la Salud), recomienda en un informe de 2012 no solo ampliar la investigación, el conocimiento y las pruebas relacionadas con los disruptores endocrinos, sino reducir la exposición a los mismos y ampliar la lista de productos químicos a examinar<sup>100</sup>.

## **5. Legislación vigente**

Entre las normas más antiguas para el control de vasos utilizados para envases se encuentra la Directiva 94/62/CE<sup>101</sup> del Parlamento Europeo y del Consejo de 20 de diciembre de 1994 relativa a los envases y residuos de envases. Esta norma establece medidas destinadas a la prevención de la producción de estos residuos y al reciclado, reutilización y revalorización de los mismos, fomentando, por tanto, su reducción y eliminación final.

Solo los envases que cumplan con los requisitos de esta norma podrán ser puestos en el mercado. Entre estos requisitos se encuentran que la composición de los mismos no suponga un riesgo para el consumidor, ni durante su uso ni posteriormente en las operaciones de gestión de residuos.

En el caso de envases reutilizables deberá ser posible que efectúen varios circuitos en condiciones normales de uso. Los envases aprovechables pueden serlo mediante el reciclado de varias o todas sus partes, mediante su uso como fuentes para recuperación de energía, mediante compostaje o siendo biodegradables. Estos últimos deberán descomponerse en última instancia en dióxido de carbono, biomasa y agua.

En 2008, la Comisión Europea y el Consejo de la Unión Europea, aprobaron la Directiva 2008/56/EC<sup>102</sup>, de 17 de Junio de 2008, en la que se establece el marco de acción comunitaria en el campo de políticas marinas medioambientales, la Marine Strategy Framework Directive (MSFD). Mediante esta directiva se establecen las medidas que todos los Estados Miembros deben adoptar para alcanzar o mantener unas condiciones medioambientales óptimas en su medioambiente marino antes de 2020. La MSFD establece el marco en el que los Estados Miembros deben tomar acción para mantener un Buen Estado Medioambiental (GES, Good Environmental Status)<sup>103</sup>, principalmente relacionado con las actividades humanas.

Se entiende que el concepto de GES está sujeto a evolución y a adaptaciones debido a factores dinámicos como cambios en los ecosistemas, nuevos descubrimientos científicos y el desarrollo de nuevas capacidades tecnológicas. Por esta razón, se realizarán evaluaciones periódicas que cambien o modifiquen las medidas adoptadas anteriormente<sup>103</sup>. Las medidas adoptadas por esta directiva deben asegurar la protección y la preservación del medio, evitar su deterioro y/o el restablecimiento del medio en zonas en las que haya sido dañado o se vea afectado gravemente. Las actividades humanas serán reguladas y enfocadas de manera que se reduzca el impacto de las mismas sobre el medio y se asegure la sostenibilidad. La MSFD establece zonas marítimas protegidas e indicadores para medir la incidencia de vertidos en las zonas costeras europeas en los que se incluyen los fondos marinos y la biota. Incluye además una lista extensa de materiales plásticos y basura encontrada en diferentes localizaciones y métodos para muestreo de diferentes fuentes.

Además, en la Unión Europea, con objeto de preservar las distintas zonas marítimas, existen tres Convenciones Marítimas Regionales que actúan bajo las directrices de la MSFD: la Convención OSPAR, para el Atlántico Nororiental; la HELCOM, la Convención de Helsinki para la protección del medioambiente marino del área del mar Báltico y la Convención de Barcelona para la protección del medioambiente de la región costera mediterránea<sup>104</sup>

Los aparejos de pesca abandonados suman un total de 11.000 toneladas al año<sup>105</sup>, constituyendo un tercio de toda la basura marina encontrada en los mares de la Unión Europea, estimándose que el 20% de los aparejos se pierden en el mar cada año. El plástico utilizado para estos materiales es de muy buena calidad por lo que tarda mucho en degradarse y muy poco porcentaje es reciclado.

El Reglamento CE 1224/2009<sup>106</sup>, en su artículo 48, establece que los buques pesqueros están obligados no solo a disponer de equipos para recuperar sus artes de pesca perdidas lo antes posible, sino a notificarlo cuando esto suceda. Los gastos relacionados con la recuperación de aparejos que no hayan sido debidamente notificados estarán a cargo del capitán del buque. El transporte a puerto y la eliminación de los residuos generados a bordo supone unos gastos a los buques que recogen estos aparejos, por lo que existe una proposición (COM (2018) 33 final)<sup>107</sup> para derogar la Directiva 2000/59/CE y modificar las 2009/16/CE y 2010/65/UE para reducir las cargas administrativas derivadas. Esto supone un incentivo para los barcos a traer de vuelta toda la basura que generan y la que puedan encontrar en el mar, contribuyendo así a la reducción de vertidos incontrolados al océano.

Todos los plásticos que vayan a estar en contacto con alimentos, deben seguir el Reglamento (UE) N° 10/2011<sup>108</sup>. En él se establece que los materiales plásticos tienen que cumplir unos requisitos de composición y declaración establecidos en los capítulos II, III y IV y establecidos en el reglamento CE N° 1935/2004 respecto a su uso, etiquetado y trazabilidad, además de haber sido fabricados de acuerdo con el reglamento CE N° 2023/2006. La lista de sustancias autorizadas para la fabricación de plásticos en la Unión Europea se recoge en el Anexo I del Reglamento N° 10/2011. Este reglamento ha sido modificado posteriormente por el 2016/1416, que corrige errores detectados en el texto anterior y recoge nuevos informes publicados basados en dictámenes científicos sobre sustancias autorizadas y materiales.

La Directiva 2015/720<sup>109</sup> del Parlamento Europeo y del Consejo de 29 de abril de 2015 modifica a la 94/62/CE en materia de normativa respecto al uso de bolsas de plástico. Entre las medidas a tener en cuenta se incluyen las acciones que deben tomar los Estados Miembros para reducir el consumo de bolsas de plástico ligeras, evitando que se puedan distribuir de manera gratuita a partir del 31 de diciembre de 2018. Las bolsas oxodegradables y oxobiodegradables presentan en su composición aditivos que provocan su microfragmentación con el paso del tiempo, permaneciendo también en el medioambiente. Esto puede inducir a error al consumidor que puede tener una percepción errónea de las mismas. El mensaje “biodegradable” induce a pensar que el material se descompone en su totalidad, cuando la realidad es que el material simplemente se fragmenta en microplásticos. Esto puede dar lugar a un aumento de su consumo y por tanto de las tasas de contaminación.

En esta directiva se deben examinar el impacto en el medioambiente de las bolsas oxodegradables e incluirse, si fuera necesario, medidas para su reducción. En el etiquetado de las bolsas biodegradables o compostables se debe informar al consumidor sobre las propiedades de las mismas ya que estos materiales solo se descomponen completamente tras ser sometidos a temperaturas superiores a los 50°C durante un tiempo prolongado, lo que no los convierte en una alternativa válida si este proceso ha de desarrollarse en condiciones medioambientales<sup>63</sup>.

Aunque en la actualidad no existe legislación, ni a nivel nacional ni europeo, relativa a la presencia de MP y NP como contaminantes en los alimentos, en 2011 la EFSA estableció un Programa Marco para la investigación e innovación en determinados proyectos de interés en las áreas de alimentación humana y animal llamado Horizon 2020. El estudio de la exposición y riesgos asociados al consumo de MP y NP en los alimentos se presenta en este informe como una necesidad dada la falta de métodos analíticos adecuados para la cuantificación e identificación de microplásticos en los alimentos<sup>110</sup>.

## **6. Métodos de análisis de microplásticos y nanoplásticos**

### **6.1. Métodos de caracterización y detección**

Como se ha comentado, es difícil encontrar métodos estandarizados para la recogida de muestras, tanto procedente de agua, como de sedimentos o biota. Las muestras han de ser representativas, lo cual supone un reto ya que la muestra debe tomarse de zonas muy extensas (playas, mares, océanos, etc.). Además, en muchas ocasiones las muestras vienen sucias y unidas a su superficie por materiales orgánicos e inorgánicos. Esto provoca que sea difícil comparar los datos de diferentes estudios que además no suelen reportarse de la misma manera ya que muchos mencionan el número de partículas y no su peso. Para poder legislar y mantener un control de los niveles de polución existentes, es importante conocer de manera precisa las concentraciones de contaminantes presentes en un determinado medio.

De manera ideal deberíamos poder contar con un método estandarizado que nos permita comparar los resultados obtenidos por diferentes estudios. La NOAA (National Oceanic and Atmospheric Administration) tiene desarrolladas unas recomendaciones de métodos de cuantificación de MP en muestras de agua, arena y sedimentos<sup>3</sup>. La ventaja de esta metodología es que los instrumentos y aparatos están ampliamente disponibles en cualquier laboratorio y no suponen un coste elevado.

### **6.1.1. Muestreo**

Dependiendo del objetivo del estudio y del equipamiento disponible, el medio de muestreo y la metodología también serán diferentes. La distribución de los microplásticos en determinados medios es variable dependiendo muchas veces de las condiciones meteorológicas, temporales o geográficas que pueden introducir modificaciones que dificultan la reproducibilidad de los estudios. La metodología y la cantidad de material recogido también tienen influencia en la reproducibilidad de los resultados obtenidos.

A la hora de realizar el muestreo, una de las primeras medidas que se deben adoptar es evitar en toda manera la contaminación cruzada por partículas de plástico procedente de otras fuentes. Todos los procedimientos de recogida y de pretratamientos deben estar exentos de elementos que contengan plástico para evitar la contaminación de las muestras. Se ha de minimizar la posible contaminación causada por fibras o partículas transportadas por el aire, y utilizar blancos que compensen esta posible fuente.

El ICES (International Council for the Exploration of the Sea) establece en su protocolo preliminar de 2016<sup>111</sup> una serie de premisas básicas a la hora de realizar el muestreo de recogida de *especies marinas*, aunque muchas de las directrices se pueden aplicar también para otro tipo de muestras. Se ha de detallar e informar del tipo de redes en el caso de que se empleen, las cuales deben estar limpias previas al muestreo. Los peces han de ser representativos de la zona o tratarse de especies ampliamente disponibles en todo el espacio marítimo. Para la zona pelágica se debería seleccionar *Scomber scombrus*, y *Clupea harengus*, para la zona bentónica *Gadus morhua* y *Limanda limanda*, para la zona costera *Platyichthys flesus* y para estuarios mejillones del tipo *Mytilus edulis* o *M. galloprovincialis*. Las muestras consistirán en unos 50 individuos por especie, tomados aleatoriamente, conservándose a -20°C en papel de aluminio o en etanol en botellas de vidrio.

Para transportar las muestras se pueden utilizar contenedores de metal<sup>112</sup>, botellas de vidrio<sup>7, 113, 114</sup>, filtros de metal<sup>112-114</sup> o papel<sup>112, 115</sup>. Se aconseja el uso de batas de laboratorio y ropa de algodón y guantes de nitrilo. Los utensilios que se vayan a utilizar deben lavarse rigurosamente y puede utilizarse papel de aluminio para protegerlos antes de su uso<sup>116</sup>.

#### **Muestras de agua**

Ya que las concentraciones de microplásticos en el medioambiente no suelen ser muy altas, los volúmenes de las muestras recogidas deben ser grandes para poder cuantificarlos adecuadamente<sup>117</sup>. Para la recogida de MP procedentes de muestras de agua marina se suelen utilizar redes de distintos tipos (bongo, plancton<sup>118</sup>, manta<sup>3</sup>, neuston<sup>57</sup>) con luz de malla

comprendida entre 0.053 y 3 mm<sup>119</sup>. Todos los datos correspondientes a las características de las redes, profundidad de recogida de muestras, distancia de arrastre, localización, o cualquier otro dato pertinente, deberá ser registrado. La ventaja de utilizar redes es que resulta un equipamiento ampliamente disponible, que no requiere de demasiada infraestructura y que puede recoger grandes volúmenes de muestra a nivel de superficie de manera rápida. El pequeño tamaño de la luz de malla de las redes para plancton hace que se recoja mucha más cantidad de MP en menos tiempo en comparación las de tipo manta, pero también que colmaten muy rápidamente por lo que pueden utilizarse durante tiempos más reducidos<sup>118</sup>.

El muestreo se puede realizar de manera aleatoria y en sitios puntuales, o mediante métodos de muestreo continuo. Kanhai et al.<sup>59</sup> recogen en su estudio muestras de agua marina correspondiente a una profundidad de 8.5 m utilizando tanto un muestreador de roseta (CTD, Conductivity, Temperature, Depth) como el sistema de bombeo del propio barco en el que se desplazaban los investigadores. El método de bombeo presenta el inconveniente de que pueden existir partes o piezas ocultas del equipamiento que sean de plástico sobre las que el investigador no tiene control, dando lugar a errores. El uso de muestras de control o blancos debería corregir estos problemas. Una de las ventajas es poder analizar muestras más grandes de agua cubriendo áreas mayores manteniendo el barco en tránsito. CTD (**Figura 16**) es un sistema muy utilizado para la recogida de muestras y cuantificación en puntos concretos, sin embargo, presenta como inconvenientes el menor volumen que es capaz de analizar y el tiempo que se pierde en la recogida de muestras en sí, teniendo que detener la embarcación. Esto puede dar lugar a falsos negativos o a una sobreestimación del contenido de plásticos.

Simon et al.<sup>114</sup> se enfrentan a un problema similar al de Kanhai al recoger muestras procedentes de plantas de tratamiento de aguas al utilizar para ello los puntos de muestreo de la propia planta. Estos puntos también contienen partes fabricadas en plástico, pero ofrecían una mayor representatividad en términos de concentración de MP.

Bannick et al.<sup>55</sup> establece el volumen de agua necesario para encontrar partículas de un tamaño determinado de acuerdo con la ecuación (1):

$$n = \frac{\ln(1-a)}{\ln(1-p)} \quad (1)$$

Donde  $a$  es la mínima probabilidad de encontrar al menos una partícula y  $p$  es la probabilidad de encontrar una partícula en el volumen de muestra, obteniéndose así recuperaciones de 80-110% dependiendo del tipo de MP y de su tamaño.



*Figura 16: Muestreador CTD roseta* <sup>120</sup>

En resumen, y teniendo en cuenta el trabajo de Bannick et al.<sup>55</sup>, para poder solventar los problemas relacionados con la falta de coherencia a la hora de presentar datos, los métodos de muestreo han de poder recoger muestras representativas de la zona donde se realice el estudio. El método ideal debería poder usarse en diferentes tipos de condiciones, tanto en aguas marinas como superficiales, potables o procedentes de plantas de tratamiento. Asimismo, debe ser capaz de recoger no solo diferentes tipos y tamaños de MP, sino de satisfacer los requerimientos de métodos de preparación y detección que se vayan a utilizar posteriormente.

### **Muestras de sedimentos**

En el caso de que las muestras provengan de sedimentos en playas<sup>65, 112, 113, 115, 116, 121, 122</sup> es conveniente tomar muestras de diferentes zonas y analizarlas posteriormente de manera individual y creando una muestra composite. Dependiendo de la zona en la que se realice la toma de muestras (zona de pleamar, bajamar o intermedia), o la profundidad que se recoja de muestra, el contenido de partículas puede variar. El procedimiento más habitual es utilizar un marco de metal de 50x50 cm<sup>112, 115</sup> que se inserta en la arena, recogiendo los 5 cm superficiales y, al menos, la capa inmediatamente inferior, también de 5 cm de profundidad, ya que la capa superior contendrá más partículas que la inferior<sup>118, 123</sup>. Otros autores<sup>122, 124</sup> utilizan sin embargo una simple pala o cuchara metálica y recogen solamente los 2 cm superficiales de la zona comprendida entre el agua y la línea de marea alta.

Besley et al.<sup>123</sup> han desarrollado un procedimiento de operación para la recogida y extracción de muestras para la cuantificación de MP en arena de playa, utilizando equipamiento y procedimientos ampliamente disponibles en cualquier laboratorio. Recomiendan la recogida de 11 muestras por cada 100 m de playa para obtener un nivel de confianza de al menos el 90% y de 22 muestras para un nivel de confianza del 99%.

### **Muestras de animales**

Otros autores utilizan muestras procedentes de plankton<sup>61, 121</sup>, mejillones y moluscos<sup>15, 63, 83, 86</sup>, gusanos<sup>84</sup>, peces<sup>60, 79-81, 85, 86, 88, 91, 125</sup> recogidos de forma manual, por redes, comprados en mercados locales o procedentes de laboratorios. Los animales se deben conservar de manera que se preserve en la mayor forma posible el contenido intestinal, para no incurrir en pérdidas previamente al análisis. Se deben minimizar los daños físicos o estrés ya que el contenido intestinal podría ser regurgitado, afectando las estimaciones de contenido estomacal<sup>125</sup>.

Cuantificar las cantidades de plásticos que se adhieren a los especímenes o que se ingieren durante el muestreo puede ser en la práctica casi imposible<sup>125</sup>, por lo que la recogida de blancos es imprescindible para poder estimar correctamente los resultados.

#### **6.1.2. Pretratamiento y purificación**

Las muestras procedentes de playas o sedimentos que presenten humedad y las procedentes del filtrado de agua de mar deberán someterse a un secado a 90°C durante toda la noche o hasta que la muestra esté seca<sup>3</sup>, determinándose posteriormente el peso de la muestra seca con la que se va a trabajar. Los resultados han de reportarse en g, kg o L por peso seco de muestra seca<sup>118, 123</sup>.

#### **6.1.3. Separación**

- **Separación por densidad**

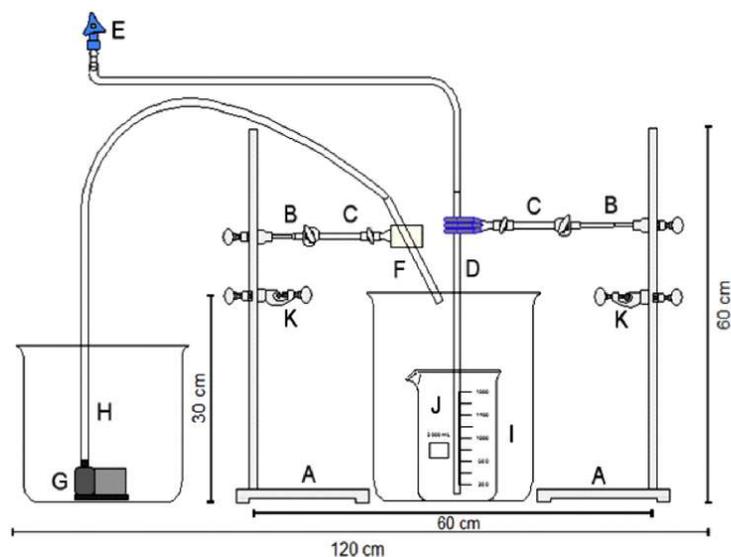
Los valores de densidad de los plásticos varían entre 0.8-1.4 g cm<sup>-3</sup>, dependiendo del tipo de polímero<sup>57</sup>. Estos valores son los de las resinas puras sin tener en cuenta las modificaciones que se puedan atribuir a la adición de aditivos o al peso añadido que pueda suponer los sedimentos o la colonización de las partículas de MP por parte de microorganismos. Gracias a estas diferencias en densidad, se pueden realizar operaciones de separación basadas en la introducción de las partículas en un medio que contiene una solución saturada de densidad superior a la de los polímeros, por lo que flotarán en él dejando en el fondo de la solución el resto de partículas que no son de interés.

La mayoría de trabajos consultados utilizan la metodología desarrollada por Thompson et al.<sup>1</sup>, que es también coherente con las recomendaciones de la NOAA<sup>126</sup> y MSFD<sup>127</sup>. La separación por densidades se realiza utilizando una solución saturada de NaCl (1.2 kg NaCl/L). Se introduce la muestra en un Erlenmeyer junto con la disolución de NaCl, se agita vigorosamente y, una vez que sedimenta, se recoge el líquido sobrenadante, se filtra y se seca a 60°C<sup>112, 115, 124</sup>. Este método solo es capaz de extraer partículas de plástico de densidad

inferior a  $1.2 \text{ g/cm}^3$ . Como alternativa se puede utilizar soluciones saturadas de NaCl de densidad  $1.8 \text{ g/cm}^3$  o CsCl (densidad máxima  $1.9 \text{ g/cm}^3$ ) o politungstato de sodio de densidad variable. Estas soluciones son capaces de extraer plásticos de densidades superiores como PET, PVC o POM (polioximetileno)<sup>112</sup>. Otra opción es utilizar KI al 50% para polímeros más densos que el agua<sup>113</sup>.

El método de extracción desarrollado por Nuelle et al.<sup>116</sup> es el que posteriormente utilizan Zhou et al.<sup>122</sup> para la separación de MP de muestras de suelos. Este método consta de dos pasos en el que primero se produce la fluidización de los sedimentos en una solución saturada de NaCl y después se provoca la flotación de los MP en una solución salina de alta densidad compuesta por NaI.

Las muestras se secan a  $60^\circ\text{C}$  y se pasan a través de un filtro de 1 mm de luz de malla. En el primer paso de fluidización se utiliza un desbordamiento inducido por aire (AIO, air-induced overflow), cuyo esquema se incluye como **Figura 17**. Mediante el surtidor de bomba se genera un flujo de aire de  $0.1 \text{ L/s}$ , tras lo que se introduce el sedimento rápidamente. Este aire introducido genera un proceso estocástico debido a la turbulencia de las burbujas, lo que empuja a las partículas más ligeras a la superficie de la solución. A continuación, se vuelve a bombear NaCl a un flujo constante de  $2.4 \text{ L/min}$  provocando el desbordamiento de la capa superior al recipiente exterior.



**Figura 17:** configuración experimental del método AIO <sup>116</sup>.

A: soportes; B, C: pinzas; D: tubo de vidrio; E: salida a campana; F: tubo de vidrio; G: surtidor de bombeo de interior; H: tanque de almacenamiento para NaCl (25 x 25 cm); I: recipiente de vidrio exterior (25 x 30 cm); J: vaso de vidrio interior (2L); K: pinzas dobles con varillas de metal paralelas.

El recipiente J se enjuaga varias veces para asegurar que todos los plásticos pasan al recipiente exterior. El sobrenadante del recipiente exterior se filtra a través de una malla metálica de 25 µm utilizando una cucharilla de metal para su trasvase y el residuo remanente en el recipiente I se lava con agua destilada y se pasa a un papel de filtro sobre un embudo y secado posteriormente a 60°C durante 12 horas.

El paso posterior de flotación consiste en utilizar el sedimento remanente de la primera etapa de fluidización e introducirlo en un matraz con disolución al 60% en peso de NaI. A continuación, se agita para mezclar, se rellena hasta la marca de calibración y se decanta. El sobrenadante de esta mezcla se filtra a vacío utilizando un filtro de nitrocelulosa. Si hiciera falta añadir H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> para digerir partículas orgánicas, se realizaría en este momento. El contenido de los filtros se analiza mediante estereomicroscopía y posteriormente con Pyr-GC/MS.

Gracias a este método se consigue reducir la cantidad de sedimentos necesaria para el análisis, por lo que también se consumen menos cantidades de NaI, que es un material caro. Puede utilizarse sal de mesa común y el método no requiere de un montaje complicado, sino que se puede realizar con materiales fácilmente disponibles, lo que lo convierte en un método sencillo y asequible para cualquier laboratorio. Una de las desventajas es que el uso de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> puede hacer reaccionar los plásticos contenidos en la muestra y complicar el análisis visual ya que puede provocar la descoloración de los mismos, por lo que solo se recomienda si existe una gran cantidad de materia orgánica en el filtro.

Si las muestras contienen un alto porcentaje de materia vegetal, Herrera et al.<sup>128</sup> proponen una nueva metodología mejorando las ya propuestas por Cole et al.<sup>61</sup>, Dehaut et al.<sup>129</sup>, Budimir et al.<sup>80</sup> y Masura et al.<sup>126</sup> utilizando etanol al 96% (v/v) ya que su densidad es inferior a la de los plásticos más comunes, con la excepción de PS, EPS (poliestireno expandido), espuma extrusionada (XPS) y PU. Estos plásticos flotarán junto con la materia orgánica y pueden ser extraídos manualmente. El EtOH es un reactivo económico y que no presenta grandes riesgos. Con este protocolo no se dañan los plásticos presentes en la muestra y además requiere de menos tiempo de operación que los anteriores protocolos.

- **Filtración**

Dependiendo del procedimiento, el proceso de filtración se lleva a cabo antes o después de la separación por densidades<sup>3, 57</sup>.

Las recomendaciones de la NOAA para muestras de agua es pasar la muestra en primer lugar a través de dos filtros metálicos de luz de malla de 5.6 mm y 0.3 mm, respectivamente, dispuestos en cascada, descartándose los sólidos que queden retenidos por el filtro de 5 mm. En el caso de muestras procedentes de playas o de sedimentos, se utiliza un filtro de 0.3 mm realizado con malla de nylon<sup>3</sup>. El uso de filtros de nylon contradice las recomendaciones de

minimizar el uso de materiales plásticos a la hora de realizar determinaciones para evitar contaminaciones cruzadas.

Se recomiendan filtros de vidrio<sup>7</sup> de 0.7 $\mu$ m y de papel<sup>57</sup> con poros de 1-2 $\mu$ m, enjuagando el vaso que contiene la muestra sobre el filtro varias veces para evitar la pérdida de partículas al realizar el trasvase, aunque también se utilizan filtros de acetato de celulosa de 5 $\mu$ m<sup>130</sup>.

- **Otros**

La extracción por fluidos presurizados<sup>131</sup> es un método prometedor para cuantificar e identificar microplásticos en distintas muestras medioambientales. Para muestras líquidas, bastaría con incluir un paso inicial de filtración con fibra de vidrio, convirtiéndola en una técnica simple, económica, rápida y que aporta uniformidad a la hora de cuantificar resultados, presentando estos en concentraciones y no en número de partículas, como hacen otros métodos.

Esta técnica utiliza un extractor de fluidos presurizado Dionex ASE-350, en una extracción en dos pasos. Utilizando metanol como disolvente a temperaturas de 100°C se extraen todos los compuestos orgánicos semivolátiles como grasas y aceites. En la segunda extracción, es posible recuperar la fracción de microplásticos utilizando diclorometano a 100°C y presiones de 1500 p.s.i.. Ofrece buenos resultados para PET y PS, aunque no tanto para PP y PE, para los que se necesita aumentar las temperaturas a un rango de entre 180-190°C para mejorar la extracción. Los extractos de DCM (Diclorometano) se evaporan a sequedad y se miden gravimétricamente, analizándose posteriormente con FT-IR para identificarlos.

Las muestras de agua procedentes de plantas de tratamiento presentan la dificultad añadida de contener no solo mucha materia orgánica en suspensión, sino también otros elementos flotantes. Para poder separar los MP adheridos de otros sólidos, Simon et al.<sup>114</sup> utilizan SDS (sodio dodecil sulfato) como surfactante antes de filtrar las muestras.

## **6.2. Digestión**

En la mayoría de las ocasiones, es necesario un paso previo de digestión para poder extraer las partículas plásticas de la muestra, en especial cuando se trata del contenido del estómago de peces y animales marinos o muestras con una alta concentración de materia orgánica.

### 6.2.1 Disección y limpieza

En muchas ocasiones los microplásticos encontrados pueden estar mezclados con residuos de conchas, rocas y otros fragmentos orgánicos. Para diferenciarlos se introducen durante unos segundos en una disolución de HCl (5%) y si el residuo es de un material calizo (conchas) se observará un burbujeo al desprenderse CO<sub>2</sub>, tal y como se muestra en la **figura 18**. De esta forma se pueden diferenciar y separar de los MP puesto que en poco tiempo desaparecen las conchas, caparazones y esqueletos de especies marinas<sup>112</sup>.



*Figura 18: reacción de disolución de conchas calizas con ácido clorhídrico*

Los microplásticos se localizan mayoritariamente en el estómago e intestinos. Para la extracción de plásticos procedentes de peces y pequeños moluscos, así como de especies de tamaños mayores, el procedimiento más común es la observación mediante microscopio de los contenidos del estómago y los intestinos diseccionados<sup>7, 60, 81, 125, 132, 133</sup>. El contenido se separa en muestras de alimento y fragmentos de residuos, categorizando estos posteriormente como plásticos o no.

Los plásticos de un tamaño inferior a 0.5 mm se pueden determinar mediante la extirpación de órganos concretos como el hígado o las agallas, o cuando se quiera determinar los riesgos relacionados con el consumo humano. En este caso se analizaría también el tejido de partes comestibles como la cola de las gambas<sup>125</sup>.

Los plásticos adheridos en el exterior se desechan sometiendo a los organismos a un tratamiento de lavado introduciéndolos en un baño con agua destilada, agua marina o incluso usando pinzas. Se puede realizar una depuración para eliminar fragmentos de plástico retenidos en los tejidos o en estado transitorio en el tracto intestinal introduciéndolos en un medio libre de plásticos, con o sin alimento, durante el tiempo suficiente para que completen la evacuación intestinal. Se ha de refrescar el medio regularmente para evitar que se vuelvan a ingerir los microplásticos expulsados<sup>125</sup>.

### 6.2.2. Homogeneización

En todos los estudios científico se menciona la homogeneización de la muestra como un paso necesario en el tratamiento de la misma. Sin embargo, pocos estudios dan detalles concretos sobre cómo realizarla. El proceso de homogeneización es necesario ya que, dependiendo de la procedencia de la muestra, esta puede presentar cantidades variables de MP.

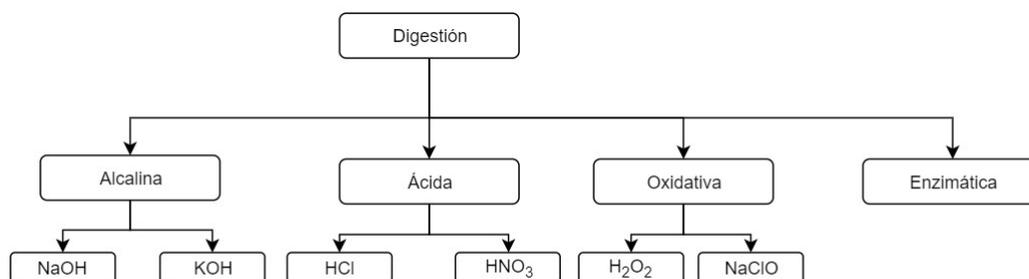
Por lo general, se seleccionan aleatoriamente las muestras recogidas y se prepara una o varias muestras composite<sup>15, 63</sup>.

Caron et al.<sup>133</sup> realizan la homogeneización de tejidos de tortuga simplemente mediante agitación manual durante un minuto utilizando una cuchara metálica. Recomiendan evitar un exceso de agitación para que las partículas de MP no se fragmenten a tamaños inferiores debido a la acción mecánica del agitado. En otros casos, las muestras se mezclan utilizando un agitador magnético<sup>83, 134</sup>, normalmente como parte del proceso de digestión, o se pulveriza la muestra con la ayuda de un mortero<sup>7</sup>.

### 6.2.3. Digestión

La etapa de la digestión es imprescindible para poder eliminar de la matriz de la muestra cualquier resto de materia orgánica que pueda contener y que podría enmascarar la cantidad real de MP que contiene. La elección del reactivo utilizado es crucial y debería optimizarse en cada situación. Diferentes protocolos emplean KOH<sup>60, 63, 83, 135</sup>, HNO<sub>3</sub><sup>113</sup>, HCl<sup>125</sup>, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub><sup>114</sup>, NaClO<sup>87, 135</sup>, ataque por microondas<sup>7</sup> y tratamientos enzimáticos<sup>61, 114</sup>. En ocasiones, estos reactivos presentan problemas de degradación de los plásticos contenidos en la muestra, o la reducción del peso de las partículas. Algunos materiales pueden llegar a fragmentarse o agruparse durante la extracción, lo que implica errores a la hora de reportar los resultados<sup>7</sup>.

Además, como se ha mencionado, la materia orgánica se confunde en ocasiones con muestras de plástico, especialmente durante la identificación visual, dando lugar a sobreestimaciones en las cantidades cuantificadas. Aunque existen diferentes procesos de digestión (**Figura 19**) y se pueden utilizar distintos reactivos, se han de cumplir las premisas de adherirse a las recomendaciones de la MSFD<sup>127</sup> y OSPAR<sup>111</sup> por la que los procedimientos han de prevenir la degradación de los polímeros para no incurrir en pérdidas de material.



**Figura 19: Diagrama para la digestión de microplásticos en muestras biológicas** <sup>80</sup>

### **Digestión con agentes oxidantes**

Los agentes oxidantes son los reactivos más ampliamente utilizados para la digestión de muestras de tejidos de animales marinos, pero presentan el problema de la falta de estabilidad de sus disoluciones, lo que ha de tenerse en cuenta a la hora de estandarizar el método<sup>136</sup>.

El peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ) es uno de los agentes oxidantes más utilizados. Nuelle et al.<sup>116</sup> emplean soluciones tanto al 30% como al 35% para eliminar la materia orgánica de muestras de sedimentos, aunque la concentración más usada para muestras en bivalvos es al 30%<sup>134, 136</sup>. Avio et al.<sup>137</sup> desarrollan un nuevo protocolo de extracción en el que consiguen rendimientos de extracción del 95% para PP y PS con disoluciones de  $H_2O_2$  de solo el 15%.

Collard et al.<sup>87</sup> emplean NaClO al 9% durante toda la noche en muestras de hígado de anchoas encontrándose que este reactivo no afectaba a los materiales plásticos presentes en la muestra. Si la muestra además se trata con una mezcla de NaClO/ $HNO_3$  se mejora la degradación, pudiendo digerir partículas de origen antropogénico sin afectar a los MP, lo que no se consigue solamente con NaClO. Esta metodología también puede utilizarse para animales marinos con dietas carnívoras ajustando los volúmenes de NaClO/ $HNO_3$  a los contenidos de grasa de las presas de estos.

Otras consideraciones a tener en cuenta son las reacciones secundarias que se pueden dar durante el proceso de digestión<sup>136</sup>. El calentamiento de  $H_2O_2$  puede dar lugar a  $O_2$  y el NaClO no debería ponerse en contacto con ácidos para evitar la generación de  $Cl_2$ .

### **Digestión ácida**

El ácido nítrico es el agente más usado debido a su alta capacidad para disolver el material orgánico, con eficacias superiores al 98%. Según Lusher et al.<sup>125</sup>, para muestras de mejillones el protocolo más eficaz consiste en emplear  $HNO_3$  69% a temperatura ambiente durante toda la noche, seguido de 2 horas a 100°C.

El protocolo de digestión recomendado por el ICES en 2016<sup>111</sup> utiliza una mezcla de ácidos  $HNO_3$ (65%): $HClO_4$ (68%) (4:1 v:v) durante toda la noche a temperatura ambiente, seguido de 10 minutos a ebullición, utilizándose 500 mL de solución ácida por 100 g de tejido de mejillón. Con este procedimiento se evita el residuo aceitoso que se observa con otros protocolos. Sin embargo, Enders et al.<sup>135</sup> encuentran que esta mezcla resulta demasiado agresiva para polímeros como poliamida (PA), poliuretano (PU), elastómero procedente de neumáticos, ABS (Acrilonitrilo, Butadieno, Estireno), polimetil metacrilato y PVC.

Dehaut et al.<sup>129</sup> recomiendan no utilizar HNO<sub>3</sub> ya que es capaz de degradar la poliamida y amarillar los plásticos. Tras la digestión ácida, tanto con nítrico como con hidrofluórico, sulfúrico y perclórico se incurre en muchas ocasiones en la destrucción de fibras o en el daño en los polímeros objeto de estudio<sup>125</sup>.

Leslie et al.<sup>7</sup> realizan la digestión con un programa de destrucción por microondas y ácido nítrico, siguiendo el protocolo de Van der Horst.

Nuelle et al.<sup>116</sup> también comparan el poder del HCl para eliminar la materia orgánica frente al peróxido de hidrógeno (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) en muestras de sedimentos, concluyendo que el HCL ofrece resultados inferiores a los ofrecidos por soluciones de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.

### **Digestión básica**

La digestión básica es una alternativa a la ácida, pero que en ocasiones también presenta inconvenientes. Dehaut et al.<sup>129</sup> elaboran una revisión para identificar un único protocolo adecuado para la caracterización de microplásticos en peces y moluscos. El primero de estos protocolos es el desarrollado por Cole et al.<sup>61</sup> en el que los plásticos se incuban a 60°C durante 24 h con 20 mL de NaOH 10 M. En el segundo protocolo con resultados satisfactorios<sup>138</sup> se utiliza una solución oxidante compuesta de peroxidosulfato potásico (K<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>8</sub>) 0.27 M y NaOH 0.24 M, incubándose los plásticos durante 24 horas a 65°C. Este método, sin embargo, no es capaz de realizar una digestión completa en los tejidos de mejillones. El uso de NaOH tampoco se recomienda ya que es capaz de destruir CA (Acetato de Celulosa), PC y PET.

Un tercer protocolo<sup>139</sup> se modificó cambiando el tiempo de incubación de tres semanas a 24 horas y aumentando la temperatura desde 21°C (temperatura ambiente) a 60°C. Esta modificación se introduce al considerarse que el tiempo empleado era demasiado largo para poder realizarse de manera rutinaria a gran escala. El reactivo empleado en este caso es KOH 10% (w/w). Este último método es el que mejores resultados arroja a la hora de extraer y caracterizar microplásticos procedentes de muestras de tejidos de moluscos, crustáceos y peces. Sin embargo, Ghosal et al.<sup>88</sup> concluyen que el uso de KOH puede dar lugar a la pérdida de COPs al modificarse la superficie del polímero.

Budimir et al.<sup>80</sup> emplean NaOH 1M combinado con SDS, un detergente común capaz de desnaturalizar proteínas y por tanto destruir materia orgánica. Esta mezcla se mantiene a 50°C, incubándose durante un total de 48 horas. Después de filtrarse, se hace reaccionar con HCl por si la muestra contuviera restos de animales calcáreos. Si aún se sospecha que pudiera existir materia orgánica se somete la muestra a un último aclarado con peróxido de

hidrógeno. Este método es especialmente apropiado cuando se trata de muestras pequeñas de alrededor de 10g y no daña las partículas de polímeros. Los reactivos utilizados son baratos y se encuentran de manera habitual en cualquier laboratorio. Aunque se recomiendan 48 horas de incubación, se observa que la mayoría de la materia orgánica se había consumido pasadas solo 2 horas.

### **Digestión enzimática**

La digestión enzimática no ataca a los MP, pero su coste es más elevado, lo que limita su aplicación a escenarios específicos.

La proteinasa-K<sup>61</sup> es capaz de digerir más del 97% de la materia orgánica en muestras de zooplancton sin causar daños a los microplásticos contenidos en la muestra. Es posible procesar muestras de gran tamaño y se evita en gran medida la contaminación externa, siendo capaz además de liberar los microplásticos ingeridos por el zooplancton. El procedimiento de digestión es el siguiente: la muestra se transfiere a un tubo que contiene una solución homogeneizante de tampón de Tris-HCl 400 mM, EDTA (ácido etilendiamintetraacético) 60 mM, NaCl 105 mM y 1% de SDS, siguiendo un proceso de incubación a 50°C durante 15 minutos. A continuación, se añade la proteinasa-K (50 µg/mL) y se vuelve a incubar durante 2 horas a 50°C. La muestra se agita junto con perclorato sódico (NaClO<sub>4</sub>) 5 M durante unos 20 minutos y se vuelve a incubar a 60°C durante 20 minutos.

La enzima celulasa<sup>114</sup> también se emplea para digerir los restos de papel presentes en muestras de agua procedentes de plantas de tratamiento, incubando durante 48 horas a 40°C con oxidación posterior utilizando H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> y Fe(II) como catalizador.

### **Otros**

Zobkov et al.<sup>140</sup> introducen variaciones a la metodología de la NOAA, en el caso de extracción a partir de sedimentos, mejorando la recuperación de fibras y de plásticos de altas densidades alcanzando valores de más de un 90%. Se utiliza una digestión fraccionada con calcita y como solución para separación de densidades ZnCl<sub>2</sub> en concentración de 1.6 g/mL, eliminando pasos que podrían introducir error como la separación manual de partículas y utilizando filtros con luz de malla inferior.

### **6.3. Identificación de microplásticos**

Siempre que se quiera analizar microplásticos será necesaria su identificación y separación de muestras naturales, aunque se presenta el problema de la falta de protocolos estandarizados de identificación. El método de identificación dependerá del número de muestras, de su naturaleza y del rango de tamaño de las partículas.

#### **6.3.1. Identificación visual**

La identificación visual se basa en las características físicas y morfológicas de las partículas mientras que las técnicas analíticas nos aportan datos sobre sus características químicas. La identificación visual es un método antiguo que se sigue utilizando ampliamente en la actualidad. Es rápido, económico y se puede llevar a cabo con un mínimo de equipamiento y personal no cualificado, aunque la correcta discriminación de partículas muy pequeñas dependerá de la experiencia del analista. Las partículas se clasifican de forma visual por colores, formas y tamaños.

Hidalgo-Ruz et al.<sup>57</sup> incluye el separado visual como un prerrequisito indispensable en la identificación de plásticos de muestras medioambientales. Este separado se realiza, como su nombre indica, a simple vista, aunque en la mayoría de métodos se suele incluir un paso previo de identificación de partículas con microscopio que no siempre proporciona resultados satisfactorios. Las muestras artificiales y naturales se confunden con frecuencia y algunas son demasiado pequeñas para poder observarse o presentan fragmentaciones, blanqueamientos o colonización por microorganismos<sup>57, 112, 115, 125</sup> que pueden dar origen a confusiones en la identificación. Mediante este método las partículas pueden categorizarse en fragmentos, fibras y películas. Los fragmentos de tamaños inferiores a 100  $\mu\text{m}$  presentan dificultades para ser identificados visualmente, por lo que se recomienda el empleo de Raman para su confirmación<sup>141</sup>. Analizar las muestras posteriormente con Raman o FT-IR soluciona el problema de falsos positivos, pero no el de falsos negativos.

Para evitar tener que realizar la separación visual de los fragmentos de MP con los problemas que ello conlleva, Harrison et al.<sup>142</sup> proponen utilizar y desarrollan los principios de un método basado en el escaneo molecular por FT-IR en muestras de sedimentos basados en su espectro. Este método, aún no siendo tan eficiente como el escaneo basado en el método de Fluorescencia Polarizada (FPA, que será descrito más adelante en el apartado 6.5.1), es una buena técnica dada su accesibilidad y comparabilidad con los análisis basados en FPA. Los resultados de la metodología de espectroscopía micro-FT-IR están condicionados a la homogeneidad o heterogeneidad de los materiales analizados, por lo que

este estudio también enfatiza la urgencia de desarrollar técnicas reproducibles y eficientes para la recolección y separación de microplásticos.

### **6.3.2. Microscopía electrónica de barrido (SEM)**

A diferencia de un microscopio convencional, en microscopía electrónica de barrido se utiliza un haz de electrones de alta energía para formar las imágenes en la óptica del instrumento. Los SEM actuales son capaces de aumentar la imagen hasta un millón de veces debido a que los electrones tienen una longitud de onda inferior a la de la luz que normalmente se utiliza, lo que permite aportar mayor resolución y poder apreciar detalles más pequeños de los materiales.

También permite determinar la composición del material que se está examinando ya que, al interactuar con la muestra, el haz de electrones emite rayos X. Se puede utilizar para obtener imágenes en tres dimensiones de la muestra. Permite examinar tanto muestras conductoras como no conductoras, en forma sólida como en polvo, secas o húmedas, por lo que no se necesita mucha preparación previa. Es una técnica no destructiva, pero está limitada a muestras sólidas que han de examinarse en vacío y se necesita bastante espacio para su instalación<sup>143</sup>.

SEM combinada con Espectroscopía de Energía Dispersiva de Rayos-X (EDS) es útil a la hora de recoger información sobre el proceso de degradación de los MP en el medioambiente, ya que proporciona una alta resolución con la que es posible identificar las diferentes grietas y fracturas formadas durante el proceso de meteorización<sup>144</sup>.

Zhou et al.<sup>122</sup> utilizan esta técnica para observar la morfología de la superficie de los polímeros encontrados en su estudio, obteniendo las imágenes por electrones secundarios para alcanzar mejores resoluciones. Fries et al.<sup>124</sup> también la utilizan para identificar los aditivos plásticos inorgánicos de MP extraídos en muestras de sedimentos del Mar del Norte. Con la ayuda de esta técnica se consigue identificar satisfactoriamente nanopartículas de dióxido de titanio, bario, sulfuro y zinc.

### **6.3.3. Fluorescencia**

El tintado de muestras utilizando Rojo de Nilo (NR) y sus capacidades fluorescentes es utilizado por varios autores como una alternativa a otros métodos en un intento de abaratar costes de análisis, especialmente en muestras procedentes de matrices medioambientales. La absorción de NR por parte de las partículas de plástico es despreciable por lo que no interfiere con la espectroscopía IR o Raman<sup>145</sup>.

Shim et al.<sup>146</sup> desarrollan este método obteniendo resultados satisfactorios para PE, PP, PS, PC, PU y PEVA (Polietilenvinil Acetato), pero no así para PVC, PA y PS. Una disolución de 5 mg/L de Rojo de Nilo en hexano se utilizó para tinter los polímeros en cuestión, analizando las muestras sobre un filtro negro de PC. Este estudio es capaz de identificar MP mezclados con otros materiales inorgánicos que podrían causar interferencias en otros métodos analíticos. La combinación de microscopía de fluorescencia y FT-IR es capaz de reducir el número de partículas no identificadas en muestras medioambientales, así como el tiempo necesario para su identificación por espectroscopía.

Es importante, sin embargo, la eliminación de material orgánico el cual podría tintarse al mismo tiempo, ya que los procesos de digestión no siempre son capaces de eliminar toda la materia orgánica. Los materiales muy deteriorados por la acción de agentes medioambientales también son difíciles de corroborar con las librerías de espectros disponibles, por lo que no se recomienda la utilización de este método como única fuente de cuantificación de microplásticos<sup>146</sup>.

Las algas y otros detritos orgánicos no se tintan de manera eficiente con NR en el protocolo desarrollado por Maes et al.<sup>145</sup> lo que mejora la selectividad a las partículas de plástico encontradas en la muestra. Los fragmentos de diferentes tipos de plásticos generan colores diferentes, ya que en este estudio se utiliza luz fluorescente azul, permitiendo diferenciarlos de otras partículas, pudiéndose utilizar este método en solitario sin necesidad de recurrir a FT-IR o Raman para contabilizar partículas de hasta unos pocos  $\mu\text{m}$ .

## **6.4. Detección y Cuantificación**

### **6.4.1. Espectroscopía de Infrarrojo con Transformada de Fourier (FT-IR)**

El principio de la espectroscopía Infrarroja se basa en la excitación de las vibraciones moleculares al hacer pasar una muestra a través de un haz infrarrojo. Esta energía vibracional se corresponde con una frecuencia de luz IR y nos aporta información sobre la composición molecular: átomos, tipos de enlace, estructura, etc<sup>147</sup>.

La espectroscopía de infrarrojo con Transformada de Fourier se desarrolló por primera vez a principios de la década de los 50 del siglo XX con el fin de estudiar el espectro de estrellas lejanas. La Transformada de Fourier es una operación matemática por la cual es posible transformar el movimiento de una onda en la suma de sus senos o cosenos, dando lugar aproximadamente a una onda cuadrada<sup>148</sup>.

Existen diferentes modos de análisis por FT-IR que nos proporcionan variadas aplicaciones cualitativas y cuantitativas y nos permiten analizar diferentes tipos de muestras.

- **Transmisión:** se basa en la absorción de radiación IR en longitudes de onda específicas a medida que pasa a través de una muestra. Es la técnica más tradicional y puede utilizarse sola o en conjunción con otros accesorios como microscopios para analizar una gran variedad de muestras. Proporciona buenos resultados tanto en análisis cualitativo como cuantitativo y es una técnica relativamente económica<sup>147, 149</sup>.
- **Reflexión:** cuando un haz de luz atraviesa un medio con distinto índice de refracción, este puede sufrir reflexión total o reflexión atenuada. Dependiendo de la variación del índice de refracción y del compuesto se obtendrá un haz reflejado con una composición que será función de estos. Este modo da lugar a una técnica con una alta sensibilidad capaz de detectar elementos del espesor de Angstroms sobre sustratos metálicos. Es un análisis no destructivo y con la que se pueden utilizar accesorios como microscopios y espectrómetros<sup>147, 150</sup>.

En *reflexión especular* se mide la energía que se refleja a modo de espejo de la superficie de la muestra, o su índice de refracción. El material debe ser reflectante o fijarse a un soporte reflectante. Resulta muy útil para analizar láminas delgadas o películas<sup>150</sup>.

La técnica de *reflexión total atenuada (ATR)* se basa en el hecho de que cuando un haz de radiación pasa a través de un prisma de alto índice de refracción tiene lugar una reflexión total en la cara posterior del prisma. Al colocar una muestra en la parte posterior del prisma, la radiación es capaz de penetrar unos micrómetros en el material antes de ser reflejada. En regiones del espectro IR donde la muestra absorbe energía, la radiación atenuada atraviesa de nuevo el prisma saliendo por el lado contrario, donde se encuentra el detector. El espectro resultante presenta un aspecto similar al de absorción ya que la radiación es absorbida selectivamente por la muestra.

Es una técnica especialmente útil para el análisis de muestras gruesas o que presentan mucha absorbancia, como recubrimientos, pinturas, espumas, elastómeros o plásticos y no se necesita preparar las muestras de ninguna manera pudiéndose analizar directamente tanto muestras sólidas (algunas deberán molerse) como líquidas<sup>147, 151</sup>.

- **Reflexión Difusa (DRIFTS):** al dirigir la radiación IR sobre la superficie de una muestra particulada la radiación incidente puede ser reflejada por la superficie de la partícula sin penetrar en ella o puede reflejarse varias veces en las superficies de las partículas sin penetrar en ellas. La reflexión difusa se produce cuando la radiación

incidente penetra en una o más de las partículas y se dispersa de la matriz de la muestra. Esta radiación dispersada es recogida por la óptica del instrumento y dirigida al detector produciendo el espectro. Es una técnica que proporciona buenos resultados cuantitativos y cualitativos, aunque Transmisión y ATR son preferibles para análisis cuantitativo debido a la longitud de paso. Se usa normalmente para muestras en polvo, sólidos de superficie rugosa, polímeros, recubrimientos e incluso líquidos en algunas condiciones, siempre que las muestras sean opacas<sup>147, 152</sup>.

La técnica de microscopía FT-IR resulta del acoplamiento entre un microscopio IR y un espectrómetro con Transformada de Fourier, lo que nos permite no solo visualizar la muestra y elegir una región de análisis, sino también adquirir datos en dos dimensiones<sup>113, 148, 153</sup>.

La gran mayoría de trabajos encontrados señalan esta técnica para verificar el contenido de micro y nano plásticos en diferentes muestras. FT-IR ofrece la ventaja de poder identificar y confirmar los tipos de polímeros existentes en una muestra, siendo capaz de recuperar señales débiles de fondos con mucho ruido. El uso de FT-IR como método de identificación contribuye a la no sobreestimación de las cantidades de plástico encontradas en una muestra dada, ya que se pueden incluir por error polímeros no sintéticos.

Song et al.<sup>115</sup> utilizan tanto estereomicroscopía como FT-IR para identificar microplásticos en muestras de aguas de mar superficiales y en muestras de arena, comprobándose la superioridad del FT-IR en este caso para la detección en las muestras de arena. Los resultados en agua de mar resultaron variables, incluso a lo largo de los meses. Esto puede ser debido a una malinterpretación de los resultados ya que se contabilizaron fragmentos blancos como polímeros sintéticos usando FT-IR, pero se descartaron al usar microscopía. Además, el microscopio ofrece limitaciones con partículas de tamaño inferior a 1 mm. El método, solo empleando el microscopio es más rápido, pero FT-IR ofrece resultados superiores en cuanto a precisión, detectándose partículas de tamaños inferiores a 50  $\mu\text{m}$ .

FT-IR puede usarse en conjunción con ATR<sup>81, 112</sup>, aunque el contacto de la muestra con el cristal de ATR puede dar lugar a la destrucción de la misma. Halstead et al.<sup>81</sup> utilizan esta técnica junto con PCA (Principal Component Analysis), una técnica estadística multivariante, que contribuye a diferenciar las fibras artificiales encontradas en las muestras de las naturales.

Harrison et al.<sup>142</sup> estudiaron la influencia de la morfología de los microplásticos en la distorsión espectral comparando ATR-FT-IR con FT-IR. ATR-FT-IR mejora la capacidad de interpretación del espectro de muestras de MP con formas irregulares en comparación con micro-FT-IR en modo reflexión, lo que puede ser debido a la dispersión del haz de infrarrojos.

SR-FT-IR utiliza la emisión de sincrotrón en el dominio infrarrojo como fuente para la microscopía FT-IR<sup>153</sup>. La radiación de sincrotrones es un haz pulsado y polarizado, cientos de veces más brillante que las lámparas usadas normalmente, y que proporciona señales de calidad con bajo nivel de ruido. Con esta técnica es posible analizar muestras de tamaño  $10^{-6}$  m, obteniendo información cuantitativa, estructural y de distribución de los componentes de la muestra<sup>154</sup>.

Uno de los avances más prometedores es el escaneo basado en una red de muchos elementos detectores (FPA-based micro-FT-IR) que facilita la generación de imágenes químicas grabando simultáneamente varios miles de espectros en una única medida, ahorrando tiempo de análisis. Esta técnica permite identificar microplásticos directamente en los filtros que se utilizan para su recolección. Se puede emplear tanto en modo transmitancia como reflectancia, aunque con el primero se obtienen resoluciones de calidad superior, probablemente debido a la forma irregular de las partículas<sup>121</sup>.

Un detector FPA consiste en un campo de  $n \times n$  detectores individuales. Durante la medida cada elemento da una lectura individual dando lugar a  $n^2$  espectros en cada barrido. En el microscopio FT-IR estos campos se pueden colocar como matrices, permitiendo la medida de campos extensos<sup>8</sup>.

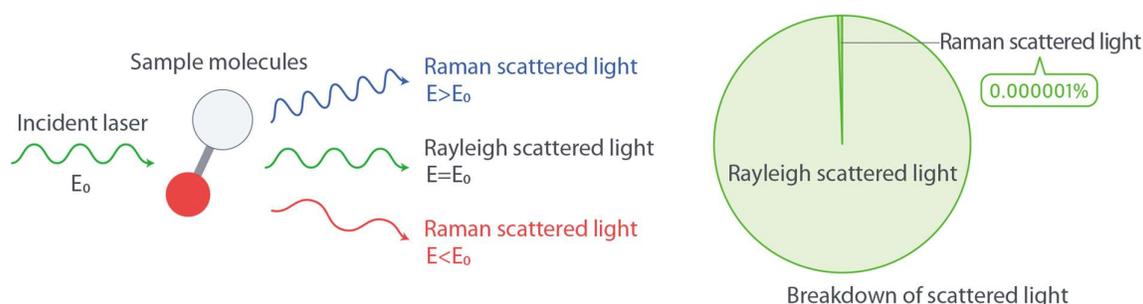
Aunque el escaneo FPA-FT-IR es una técnica adecuada para identificar el material de partículas de tamaño del orden de micrómetros, sus resultados a la hora de estimar la masa son solo aproximados. Para estudiar el rendimiento a la hora de eliminar MP de las plantas de tratamiento de aguas, Simon et al.<sup>114</sup> emplean un método basado en esta técnica para estimar la masa de MP contenidos antes y después del tratamiento. Para calcular la masa, se calculan las dimensiones de las partículas encontradas utilizando FPA-FT-IR. Se calcula así su volumen, asumiendo una forma elipsoide para las partículas y cilíndrica para las fibras y se utiliza la densidad de los polímeros a partir de bibliografía.

Harrison et al.<sup>142</sup> también proponen FPA-FT-IR como una manera rápida de escanear toda la superficie de muestras de sedimentos y mejorar así los resultados obtenidos en su método basado en FT-IR en modo reflexión.

Incluso en situaciones en las que FT-IR no detecte como plásticos ciertas partículas, debido a su espesor o a su color, es posible seguir reportando estos resultados como plásticos, ya que cualquier otro tipo de material orgánico habría sido destruido previamente en el proceso de digestión<sup>7</sup>.

### 6.4.2. Raman

La espectroscopía Raman, se basa fundamentalmente en la dispersión de la luz causada por su interacción con la materia, puede clasificarse como elástica (dispersión de Rayleigh o Mie-Tyndall), en la que la luz dispersada tiene la misma frecuencia que la luz incidente, o inelástica (dispersión de Raman o Brillouin), en cuyo caso, la luz dispersada se detecta a diferentes frecuencias constituyendo el espectro de la muestra<sup>155</sup>. La **figura 20** muestra de forma esquematizada la dispersión de la luz al interactuar con las moléculas.

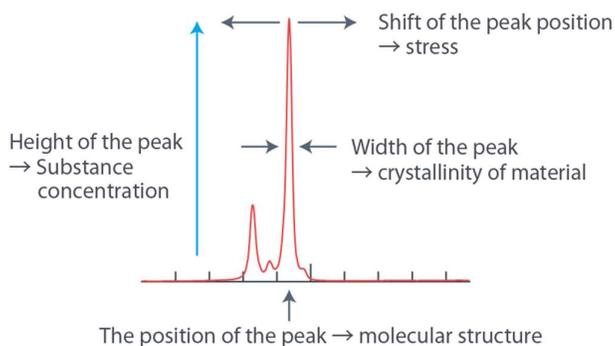


**Figura 20: Dispersión de la luz por las moléculas** <sup>156</sup>

Brillouin y Smekal fueron los primeros en predecir teóricamente la dispersión inelástica de la luz a principios de la década de 1920 y las primeras observaciones experimentales se realizaron por C.V. Raman y Krishnan en 1928<sup>148, 155</sup>. La microespectroscopía Raman nace como tal en 1966 de la mano de Delhaye y Migeon al publicar sendos artículos en los que se demostraba que la intensidad de la luz dispersa no disminuye al disminuir el volumen de la muestra, sino que permanece constante aunque la cantidad de muestra disminuya hasta las dimensiones determinadas por el índice de difracción y, por tanto, por la longitud de onda del láser de excitación. La aplicación de métodos de Transformada de Fourier y de distintos algoritmos a Raman ha permitido suprimir las interferencias derivadas de la fluorescencia de la muestra<sup>88, 155</sup>.

La luz incidente interactúa con la molécula, distorsionando la nube de electrones y expulsándose un fotón con luz dispersada. Cuando un electrón es excitado desde el estado basal a un nivel vibracional mediante absorción de energía por parte de la molécula, la luz dispersada tiene menos energía que la luz incidente. Hablamos en este caso de dispersión Stokes-Raman. Anti-Stokes Raman es el proceso contrario, en el que un electrón en un nivel vibracional cae al estado basal, produciéndose una transferencia de energía al fotón, por lo que la luz dispersada tiene más energía que la incidente<sup>155, 156</sup>.

Los picos que aparecen en el espectro son consecuencia de la vibración molecular o de la vibración de la red cristalina. Su posición nos aporta información sobre los grupos funcionales y la cristalinidad, la concentración es proporcional al área bajo el pico y cualquier forma de estrés residual dentro de la estructura cristalina de la muestra pueden deducirse a partir de la forma y la anchura del pico<sup>148, 156</sup> (**Figura 21**).



**Figura 21: Información obtenida a partir del pico del espectro Raman** <sup>156</sup>

Los espectros Raman se obtienen irradiando la muestra con una fuente de radiación visible monocromática, normalmente láseres sólidos o de gas de alta intensidad. Durante la irradiación, el espectro de radiación dispersada se mide normalmente a 90° con un espectrómetro adecuado para la región visible. La interacción de los movimientos de vibración y/o rotación de las moléculas con la radiación electromagnética, dan lugar al efecto Raman. El láser se enfoca sobre la muestra utilizando una lente de 10-30 cm de longitud, lo que aumenta la intensidad de la dispersión pero también puede dar lugar a daños en la muestra, aunque en principio se entiende Raman como una técnica no destructiva<sup>148, 155, 157</sup>.

Como hemos mencionado anteriormente, la mayoría de trabajos emplean FT-IR para la identificación de MP en el medio marino. Sin embargo, la microespectroscopía Raman es complementaria a FT-IR, compartiendo varias de sus ventajas, como pueden ser la pequeña cantidad de muestra necesaria para el análisis, ser una técnica no destructiva y ser una técnica respetuosa con el medioambiente<sup>141, 158</sup>, aportando en ocasiones información más amplia sobre la naturaleza de la muestra<sup>81</sup>.

Por otro lado, Raman proporciona numerosas ventajas adicionales como una mejor respuesta a los enlaces simétricos y no polares o la capacidad de poder usar todo el espectro para la identificación, pudiendo así rebajar el límite inferior de tamaño de partícula<sup>158</sup>. Además, Raman no depende de la transmisión del haz de luz a través de la muestra, por lo que permite identificar partículas más gruesas o con una absorción mayor.

Entre los usos más destacados para los que podemos utilizar la espectroscopía Raman se encuentra la identificación de sustancias o impurezas en muestras, la identificación de

polimorfismos, la monitorización de cambios en las estructuras moleculares y los cambios de cristalinidad, la evaluación de la magnitud del estrés residual y de la dirección de la orientación molecular<sup>156</sup>. Raman es capaz de analizar tanto las partículas de MP como sus pigmentos<sup>81, 157</sup>.

De acuerdo con distintos estudios<sup>71, 157</sup> con espectroscopía Raman se pueden analizar MP de tamaño incluso inferiores a 1  $\mu\text{m}$  con técnicas no lineales, capaces de superar el límite de Abbe o límite de difracción, el cual establece los 0.2  $\mu\text{m}$  como límite de resolución para la microscopía óptica<sup>159</sup>. La partícula más pequeña encontrada en una muestra real presenta un tamaño de 1  $\mu\text{m}$ <sup>160</sup>. Para poder alcanzar estos límites se recomienda el uso de láseres con 532 nm o 633 nm y objetivos con una elevada apertura numérica y distancias de trabajo suficientemente altas, así como objetivos con capacidad de aumento de 50x o 100x<sup>157, 160</sup>.

En un intento de ahorrar tiempos de análisis y para poder determinar mejor los efectos medioambientales de los MP y su comportamiento, Lenz et al.<sup>141</sup> proponen el muestreo *in situ* en los barcos de investigación, haciendo que el flujo de agua fluya directamente por la celda del microespectrómetro de Raman. De esta manera se elimina la necesidad de conservar las muestras en filtros, utilizando simplemente un paso previo de preconcentración.

Frère et al.<sup>161</sup> van un paso más allá desarrollando un método semi-automático capaz de analizar muestras de volumen considerable, utilizando los mismos parámetros analíticos para todos los tipos de partículas y evitando tener que crear submuestras para el análisis. Empleando un tiempo de análisis inferior a 3 horas es posible caracterizar más de 110 partículas, obteniendo tanto sus características morfológicas como químicas. Ya que se emplea solo un único instrumento, se evitan los problemas derivados de la pérdida o transferencia de partículas.

### **6.4.3. Pyr- GC**

La cromatografía de gases con pirólisis (Pyr-GC), normalmente acoplada a un espectrómetro de masas (MS), analiza los productos de degradación de los polímeros para obtener información acerca de sus estructuras. Requiere del calentamiento de la muestra a altas temperaturas, descomponiéndola en moléculas más pequeñas que se separan por cromatografía de gases y se analizan por espectrometría de masas. Es una técnica de gran utilidad a la hora de diferenciar entre muestras de polímeros similares y para la identificación de muestras desconocidas<sup>162-164</sup>

Normalmente la muestra se pone en contacto con un hilo de platino o se coloca en un tubo de cuarzo, empleándose temperaturas de entre 600-1000°C para la pirólisis. Las moléculas grandes se fraccionan produciendo fragmentos más volátiles, reacción que en ocasiones es facilitada por un agente metilante. Una vez se ha producido la pirólisis, se introduce en el GC junto con el gas transportador, produciéndose su separación en función de su volatilidad. Las partículas más volátiles salen antes de la columna que las menos volátiles. La temperatura de la pirólisis, así como la distancia que ha de recorrer la muestra entre el pirolizador y la cámara de iones, son factores fundamentales que influyen en los productos detectados<sup>162, 164</sup>.

Para generar el espectro de masas, se ionizan las partículas de las moléculas volátiles y se pasan por un campo electromagnético que filtra los iones en función de sus masas. Estos espectros se comparan con las librerías de compuestos disponibles para identificar la molécula en cuestión<sup>164</sup>.

La pirólisis secuencial se realiza analizando muestras idénticas bajo diferentes condiciones como, por ejemplo, aumentando la temperatura de pirólisis. Este procedimiento puede ser una herramienta de utilidad para la extracción de aditivos orgánicos de polímeros a temperaturas más bajas antes de determinar los productos de la pirólisis de los polímeros, ya que estos pueden plantear problemas a la hora de identificar una muestra desconocida<sup>124, 162, 163</sup>. También se emplea con éxito para la identificación simultánea de partículas de MP de distinta naturaleza, pudiéndose identificar partículas de tamaño inferior a 350µm <sup>124</sup>.

La principal ventaja de Pyr-GC/MS sobre FT-IR es que los tipos de polímeros y de aditivos se pueden analizar en una sola pasada y se puede obtener la huella perteneciente a los polímeros, aportándonos información sobre el origen de estos. Los aditivos suelen pasar intactos tras el proceso de pirólisis, por lo que son fácilmente identificables. Pyr-GC/MS es un método automatizable y bastante efectivo tanto a nivel económico como en tiempo de análisis, ya que es capaz de analizar hasta 100 muestras por pasada. Es una técnica rápida y que no requiere de grandes tamaños de muestra que además se pueden procesar sin tratar <sup>124, 162, 163, 165</sup>.

Pyr-GC es capaz de identificar la mayoría de plásticos de consumo, como por ejemplo PVC, PC, PE, PU, PA, ABS, PET, LDPE/EVA, PP, PS y EVA (Etilvinilacetato)<sup>116, 124</sup>. Sin embargo, en algunos casos, es difícil diferenciar entre distintos subtipos de polímeros como por ejemplo LDPE y HDPE<sup>129</sup>.

#### **6.4.4. Otros métodos**

En la bibliografía consultada se han encontrado también otros ejemplos de técnicas utilizadas para la caracterización de MP, normalmente usadas en conjunción con otros métodos de detección.

Dümichen et al.<sup>166</sup> emplean cromatografía de gases con una combinación de TGA (análisis termogravimétrico) y TDS (desorción térmica) que denominan TED, capaz de identificar muestras medioambientales de manera rápida en casos en los que la distribución de tamaños no sea un parámetro importante para la investigación. Gracias a esta técnica se pueden identificar muestras de hasta 100 mg en 2 o 3 horas.

La calorimetría diferencial de barrido (DSC) identifica los tipos de polímeros por la detección de reacciones exotérmicas o endotérmicas, midiendo la temperatura de cristalización durante las etapas de enfriamiento. Las medidas están fuertemente influenciadas por la historia térmica y la morfología de la muestra. Ya que en muchas ocasiones los análisis para desarrollar un método concreto se realizan con muestras de referencias de polímeros puros y libres de contaminantes, Kühn et al.<sup>167</sup> manufacturan su propia muestra de MP crio-moliendo diferentes muestras de residuos plásticos de mayor tamaño recogidas en la playa hasta alcanzar una distribución de tamaños de entre 4.5 y 0.2 mm. En este caso, DSC se utiliza para verificar que se había conseguido la misma composición que en la muestra de macropolímeros original.

En el mismo estudio se evalúan también ICP (Plasma acoplado inductivamente) con espectroscopía de emisión óptica (OES), ICP-MS y espectrometría de rayos X de energía dispersiva para discernir cuál de los tres métodos es el más eficiente a la hora de detectar metales en plásticos. Ambos métodos ICP son capaces de detectar el mismo número de metales pesados y ligeros y elementos metálicos, aunque para análisis rutinario y cuantificación se recomienda ICP-OES precedido de un paso de digestión con HF.

La utilización de técnicas de radiotrazado nos permite obtener información sobre los efectos de MP en la biota marina. Con estas técnicas es posible hacer el seguimiento de las rutas metabólicas de sorción y desorción de contaminantes, así como su distribución, impacto y acumulación en los tejidos, y el paso de los mismos a través de la cadena alimentaria. Por otro lado, a pesar de sus ventajas, estas técnicas son difíciles de aplicar debido a la necesidad de contar con personal, equipamiento e instalaciones especializadas, además de tener en cuenta las limitaciones de seguridad que conlleva el uso de material radioactivo, ya que no se puede incurrir en impacto físico o biológico en el sistema estudiado<sup>168</sup>.

Siempre resulta una ventaja que un método sea, además de fiable, rápido, no destructivo y que requiera de poca o ninguna preparación. Con estas premisas, Serranti et al.<sup>56</sup> desarrollan un método basado en imagen hiperespectral (HSI) en longitud de onda corta en infrarrojos para clasificar y cuantificar MP en muestras de agua marina. Este método presenta ventajas sobre FT-IR ya que este último requiere de partículas transparentes y en pequeñas cantidades además de necesitar mayores tiempos de análisis. HSI consigue clasificar los polímeros por tipos, proporcionando información morfológica y morfométrica de una sola pasada. ToF-SIMS (tiempo de vuelo con escaneo de espectrometría de masas) también se puede utilizar sin necesidad de pasos previos de limpieza llegando a identificar partículas de tamaños 1-5  $\mu\text{m}$ <sup>77</sup>.

## **7. Limitaciones de las técnicas con respecto a la detección y cuantificación de microplásticos**

### **7.1. FT-IR**

Aunque FT-IR es la técnica más utilizada para la identificación de plásticos, presenta ciertas limitaciones que es necesario mencionar.

Las mezclas son difíciles de identificar a no ser que ya existan en las librerías espectros correspondientes a esas mismas mezclas. Las partículas han de estar secas y su color puede presentar problemas a la hora de realizar las mediciones. Los polímeros sintéticos de color negro contienen por lo general negro de carbón como aditivo para mejorar su resistencia frente a la radiación UV y este aditivo es capaz de absorber completamente el haz infrarrojo<sup>83</sup>. Asimismo, las fibras transparentes tampoco generan espectro, lo que no permite su confirmación<sup>7</sup>.

El tamaño de partícula detectada se encuentra en torno a los 50  $\mu\text{m}$ , siendo inferior a los límites que se pueden alcanzar con Raman, y el espesor de la muestra también es un factor limitante<sup>77, 81, 88</sup>. Si las partículas son muy irregulares o presentan superficies muy rugosas pueden dar lugar a fenómenos de dispersión de la señal (scattering) cuando se opera en modo reflectancia, dando lugar a modificaciones en la línea de base y a interferencias ocasionadas por ruido en los picos del espectro<sup>114, 142</sup>. Si además se trata de partículas muy elásticas, también van a presentar dificultades a la hora de poder sujetarlas bien con el vidrio para realizar la medición, ya que tienden a recuperar su forma<sup>83</sup>.

FT-IR es un método más caro y que también requiere de mayores tiempos de análisis, ya que las partículas se han de identificar una a una, lo que puede subsanarse utilizando detectores FPA<sup>8, 115</sup>.

## **7.2. Raman**

El uso más amplio de Raman como técnica para análisis de MP se ve limitado debido a que proporciona señales débiles y a su tendencia a la distorsión espectral inducida por fluorescencia<sup>158</sup>, debido a los constituyentes de la muestra o a impurezas como la presencia de colorantes, material biológico o productos de degradación.

La debilidad de la señal provoca que se deban aumentar los tiempos de medida lo que puede causar una degradación de la muestra al estar expuesta al láser durante un tiempo prolongado. La fluorescencia provoca que la línea de base se eleve, camuflando completamente la señal Raman, lo cual se puede evitar utilizando técnicas Raman no lineales, aunque requieren de material de análisis más caro y de formación específica del analista.

Para evitar los problemas relacionados con la fluorescencia se puede optar por protocolos en los que se incluya pasos de limpieza adecuados para eliminar los contaminantes. Sin embargo, algunos de estos protocolos basados en digestiones ácidas pueden dar lugar a la destrucción de la muestra y a subestimar las cuantificaciones de MP y NP<sup>129, 158</sup>. Otra solución es el fotoblanqueamiento<sup>158</sup>, sometiéndola a la acción de un láser el tiempo necesario para degradar el agente fluorescente o la utilización de un algoritmo que elimina el fondo de fluorescencia revelando el espectro del polímero.

Para solucionar los problemas relacionados con la baja intensidad de señal en Raman, y los elevados tiempos requeridos para adquirir la señal, se puede optar por detectores EM-CCD (electron-multiplying charged coupled device detector), capaces de amplificar la señal en el orden de 10-20 veces comparado con CCD y reducir los tiempos de análisis significativamente<sup>169</sup>.

Otro problema con el que se encuentran los analistas es la existencia de librerías de espectros basadas únicamente en polímeros puros y no en plásticos que han estado sometidos a la acción del medioambiente y que se encuentran en diferentes etapas de su proceso de degradación. Sería interesante incluir además el espectro de otros materiales que a menudo se confunden con plásticos, como puede ser la celulosa, la quitina o las fibras sintéticas. La creación de una librería de espectros de acceso abierto y global sería de mucha utilidad<sup>158</sup>, como ya se aplica en otros campos.

### **7.3. Pyr-GC**

La principal desventaja de Pyr-GC/MS es que se trata de una técnica con un alto coste económico y que necesita de cantidades de muestra relativamente altas para un solo análisis. Los espectros son más difíciles de identificar en el caso de copolímeros, en los que existe una gran variedad de estructuras oligoméricas<sup>162, 163</sup>.

Una de las limitaciones de este método es el tamaño de partícula máximo que puede analizarse debido al diámetro de los tubos de desorción térmica, normalmente de tamaño 1.5 mm. Para evitarlo se puede cortar las partículas en fragmentos más pequeños antes de ser analizadas<sup>124</sup>. Las masas que se emplean suelen estar en torno a los 0.5 mg<sup>166</sup>, lo que dificulta el análisis de mezclas complejas como pueden ser las procedentes de muestras mediambientales. Por otro lado, el tamaño mínimo dependerá de la pericia del analista a la hora de transferir los fragmentos a los tubos y de la visibilidad que se pueda alcanzar gracias al instrumento SEM<sup>124</sup>.

## **8. Conclusiones**

El problema que los micro y nanoplásticos generan en el medioambiente y las repercusiones y efectos que pueden tener en la salud humana y en la biota es objeto de estudio en numerosos artículos. Las consecuencias derivadas de la ingestión de MP y su impacto depende de las concentraciones y tipo de plásticos, así como de los aditivos o de la capacidad de los plásticos para transportar otras sustancias tóxicas. Dependiendo de la especie, de su tamaño, hábitat y tipo de alimentación, los efectos van desde una simple irritación del tracto intestinal a la transferencia de sustancias tóxicas a las crías o a la acumulación de contaminantes en los diferentes tejidos del organismo. Estas sustancias se transfieren a lo largo de la cadena trófica llegando al ser humano en última instancia. Es importante establecer especies que sirvan de indicadores para la determinación de las cantidades de MP presentes en una zona determinada.

Los esfuerzos legislativos solo podrán tener éxito si se mejora la conciencia global del problema. Las campañas para informar a la ciudadanía y las iniciativas que supongan incentivos a la hora no solo de reciclar, sino especialmente de reducir el consumo de plásticos, podrían empezar a mejorar un problema que debe ser atajado inmediatamente. Se necesita encontrar soluciones que mejoren el ciclo de vida de los productos plásticos, eliminando o evitando en la medida de lo posible los plásticos de un solo uso. Las legislaciones en este campo son responsabilidad de todos los países, puesto que se trata de un problema global y que atañe a diferentes sectores. La sociedad también tiene la responsabilidad de reclamar

de sus gobiernos las medidas necesarias para solucionar estos problemas. Es precisa la firma de protocolos y acuerdos internacionales.

Evidentemente, cualquier decisión respecto a las regulaciones que se implementen en relación a los MP debería siempre estar basada en datos objetivos y en métodos científicos, para poder informar a todos los sectores involucrados debidamente y crear una mayor conciencia y educación del problema a todos los niveles. Sin embargo, hoy en día éste es un problema sin resolver. En la actualidad existen una gran variedad de métodos de muestreo, identificación, detección y cuantificación pero que no están estandarizados. Es difícil poder encontrar un único protocolo ya que normalmente este debe adaptarse a las características de la muestra, las cuáles son muy variadas en su naturaleza y procedencia. Además, la disparidad en la forma de reportar los resultados dificulta su comparación entre los diferentes estudios realizados. Esto es un problema añadido a la hora de establecer límites o regulaciones y de poder aplicar las medidas correctivas o preventivas necesarias. La contaminación cruzada con otras partículas plásticas presentes en el ambiente añade dificultades a las ya derivadas del trabajo con micro y nanopartículas.

Dentro de la disparidad de métodos de detección y cuantificación existentes, FT-IR y Raman son los más ampliamente utilizados y donde más bibliografía encontramos. Ambos métodos se complementan, ofreciendo ventajas donde el otro presenta limitaciones. En general, el análisis de muestra medioambientales requiere de métodos y técnicas que sean rápidas, económicas, ampliamente disponibles en la mayoría de laboratorios y que permitan procesar grandes cantidades de muestras.

## Bibliografía

1. Thompson, R. C.; Olsen, Y.; Mitchell, R. P.; Davis, A.; Rowland, S. J.; John, A. W. G.; McGonigle, D.; Russell, A. E., Lost at sea: Where is all the plastic? *Science*: 2004; p 838.
2. New Plastics Economy Report offers blueprint to design a circular future for plastics. <https://www.ellenmacarthurfoundation.org/news/new-plastics-economy-report-offers-blueprint-to-design-a-circular-future-for-plastics> (accessed 17 febrero 2019).
3. Arthur, C.; Baker, J.; Bamford, H., Proceedings of the International Research Workshop on the Occurrence, Effects and Fate of Microplastic Marine Debris. NOAA Technical Memorandum: 2008.
4. Gigault, J.; Halle, A.; Baudrimont, M.; Pascal, P. Y.; Gauffre, F.; Phi, T. L.; Hadri, H. E.; Grassl, B.; Reynaud, S., Current opinion: What is a nanoplastic? *Environmental Pollution*: 2018; pp 1030-1034.
5. Frias, J. P. G. L.; Nash, R., Microplastics: Finding a consensus on the definition. *Marine Pollution Bulletin*: 2019; pp 145-147.
6. Liu, M.; Lu, S.; Song, Y.; Lei, L.; Hu, J.; Lv, W.; Zhou, W.; Cao, C.; Shi, H.; Yang, X.; He, D., Microplastic and mesoplastic pollution in farmland soils in suburbs of Shanghai, China. *Environmental Pollution*: 2018; Vol. 242, pp 855-862.
7. Leslie, H. A.; Brandsma, S. H.; van Velzen, M. J. M.; Vethaak, A. D., Microplastics in route: Field measurements in the Dutch river delta and Amsterdam canals, wastewater treatment plants, North Sea sediments and biota. *Environmental International*: 2017; pp 133-142.
8. Mintenig, S. M.; Int-Veen, I.; Löder, M. G. J.; Primpke, S.; Gerdt, G., Identification of microplastic in effluents of waste water treatment plants using focal plane array-based micro-Fourier-transform infrared imaging. *Water Research*: 2016; pp 365-372.
9. Mendenhall, E., Oceans of plastic: A research agenda to propel policy development. *Marine Policy*: 2018; pp 291-298.
10. Shomura, R. S.; Yoshida, H. O. In *Proceedings of the workshop on the fate and impact of marine debris*, National Oceanic and Atmospheric Administration: 1985.
11. Trowsdale, A.; Housden, T.; Meier, B. 5 gráficos para entender por qué el plástico es una amenaza para nuestro planeta. <https://www.bbc.com/mundo/noticias-42304901> (accessed 27 febrero 2019).
12. Wagner, M.; Lambert, S., *Freshwater Microplastics. Emerging Environmental Contaminants?* Springer: 2018; Vol. 58.
13. Eriksen, M.; Lebreton, L. C. M.; Carson, H. S.; Thiel, M.; Moore, C. J.; Borrero, J. C.; Galgani, F.; Ryan, P. G.; Reisser, J., plastic Pollution in the World's Oceans: More than 5 Trillion Plastic Pieces weighing over 250,000 Tons Afloat at Sea. *Plos ONE*: Vol. 9.
14. Ogonowski, M.; Gerdes, Z.; Gorokhova, E., What we know and what we think we know about microplastic effects – A critical perspective Current Opinion in Environmental Science & Health: 2018; pp 41-46.
15. Cho, Y.; Shim, W. J.; Jang, M.; Han, G. M.; Hong, S. H., Abundance and characteristics of microplastics in market bivalves from South Korea. *Environmental Pollution*: 2018.
16. Fossi, M. C.; Coppola, D.; Bains, M.; Gianetti, M.; Chuerranti, C.; Marsili, L.; Panti, C.; Sabata, E.; Clò, S., Large filter feeding marine organisms as indicators of microplastic in the pelagic environment: The case studies of the Mediterranean basking shark (*Cetorhinus maximus*) and fin whale (*Balaenoptera physalus*) *Marine Environmental Research*: 2014; pp 17-24.
17. A European Strategy for Plastics in a Circular Economy. <http://ec.europa.eu/environment/circular-economy/pdf/plastics-strategy.pdf> (accessed 17 febrero 2019).
18. Polymers and Plastics. [http://www.chem.ucalgary.ca/courses/350/laboratory/expt353\\_plastics.pdf](http://www.chem.ucalgary.ca/courses/350/laboratory/expt353_plastics.pdf) (accessed 7 febrero 2019).
19. Plástico. <https://es.wikipedia.org/w/index.php?title=Especial:Citar&page=Pl%C3%A1stico&id=113512483> (accessed 7 febrero 2019).
20. Brydson, J., *Plastic Materials*. 7 ed.; Butterworth-Heinemann: 1999.
21. Kalpakjian, S.; Schmid, S. R., *Manufactura, ingeniería y tecnología*. 4 ed.; Pearson Educación: 2002.
22. The History and Future of Plastics. <https://www.sciencehistory.org/the-history-and-future-of-plastics> (accessed 7 febrero 2019).
23. Hjertberg, T.; Sorvik, J., *J. Macromol. Sci., Pure Appl. Chem. E.*: pp 983-1004.
24. Díaz del Castillo Rodríguez, F. Conformado de materiales plásticos. [http://olimpia.cuautitlan2.unam.mx/pagina\\_ingenieria/mecanica/mat/mat\\_mec/m6/conformado%20de%20plasticos.pdf](http://olimpia.cuautitlan2.unam.mx/pagina_ingenieria/mecanica/mat/mat_mec/m6/conformado%20de%20plasticos.pdf) (accessed 8 febrero 2019).
25. Tabla de clasificación de plásticos. [http://roble.pntic.mec.es/jprp0006/tecnologia/3eso\\_recursos/unidad9\\_los\\_plasticos/descargas/tabla\\_clasificacion\\_plasticos.pdf](http://roble.pntic.mec.es/jprp0006/tecnologia/3eso_recursos/unidad9_los_plasticos/descargas/tabla_clasificacion_plasticos.pdf) (accessed 8 febrero 2019).
26. Beltrán Rico, M.; Marcilla Gomis, A., *Tecnología de polímeros*. Universidad de Alicante: 2012.
27. Callister, W. D. J., *Introducción a la Ciencia e Ingeniería de los Materiales 2*. Reverté: 2007.
28. Siliconas. <https://tecnologiadelosplasticos.blogspot.com/2011/12/siliconas.html> (accessed 15 junio 2019).
29. Perez, J. M.; Kontur, W. S.; Alherech, M.; Coplien, J.; Karlen, S. D.; Stahl, S. S.; Donohue, T. J.; Noguera, D. R., Funneling aromatic products of chemically depolymerized lignin into 2-pyrone-4-6-dicarboxylic acid with Novosphingobium aromaticivorans. *Green Chemistry* 2019.
30. Riba Romeva, C., *Selección de materiales en el diseño de máquinas*. Edicions UPC: 2008.
31. Britannica, T. E. o. E. Polyethylene. <https://www.britannica.com/science/polyethylene> (accessed 8 febrero 2019).
32. LDPE. <https://www.deccanchronicle.com/opinion/columnists/160419/plastic-surgery-1.html> (accessed 15 junio 2019).
33. HDPE. <https://www.acronplastics.co.nz/materials.html> (accessed 15 junio 2019).
34. Groover, M. P., *Fundamentos de Manufactura Moderna. Materiales, procesos y sistemas*. Pearson: 1997.
35. Plásticos. <http://ocw.usal.es/enseñanzas-tecnicas/materiales-ii/contenidos/PLASTICOS.pdf> (accessed 8 febrero 2019).
36. Britannica, T. E. o. E. Polypropilene. (accessed 20 Mayo 2019).
37. Vasos. <https://www.plasticosycaucho.com/la-mayoria-de-las-compras-de-poliopropileno-imitan-la-evolucion-de-la-materia-prima-miercoles-26-de-julio-de-2017> (accessed 15 junio 2019).
38. Fundas. [https://www.amazon.de/Herma-19992-Heftumschl%C3%A4ge-transparent-Heftschoner/dp/B004LBBB70?ref=fspr\\_pl\\_dp\\_15\\_197755031](https://www.amazon.de/Herma-19992-Heftumschl%C3%A4ge-transparent-Heftschoner/dp/B004LBBB70?ref=fspr_pl_dp_15_197755031) (accessed 15 junio 2019).
39. Cuerdas. <http://www.kiavy.be/animalerie/search/B00WOXVQUEU-seilwerk-stanke-100-m-6.html> (accessed 15 junio 2019).
40. Pañales. <https://ecoembesdudasreciclaje.es/contenedores-de-panales/> (accessed 15 junio 2019).

41. Polystyrene. <https://www.plasticseurope.org/en/about-plastics/what-are-plastics/large-family/polystyrene> (accessed 10 febrero 2019).
42. Envases. <https://ecocosas.com/noticias/prohiben-en-nueva-york-recipientes-de-poliestireno-para-comida-rapida/> (accessed 15 junio 2019).
43. Aislante termoacústico. <http://www.archiexpo.es/prod/isosystem/product-55554-1315811.html> (accessed 15 junio 2019).
44. Pajitas. <https://clusterpack.org/2019-comienzo-con-prohibiciones-de-envases-de-espuma-y-pajitas/> (accessed 15 junio 2019).
45. Disposable syringe. <https://www.fanevalleystores.com/categories/cattle/health-products/veterinary-supplies/products/29073/Disposable-5ml-Syringe> (accessed 15 junio 2019).
46. Polyvinyl chloride. <https://www.britannica.com/topic/industrial-polymers-468698/Polyvinyl-chloride-PVC> (accessed 10 febrero 2019).
47. Patrick, S. G., *Practical guide to Polyvinyl Chloride*. Rapra Technology Limited: 2005.
48. PVC Pipes. <https://www.utkarshindia.in/products/pvc-pipes/> (accessed 15 junio 2019).
49. PVC Air Hose. <https://www.miltonindustries.com/index.php/25-3-8id-x-3-8npt-pvc-hose.html> (accessed 15 junio 2019).
50. PVC Window frame. <https://www.indiamart.com/proddetail/white-pvc-window-frames-9132472455.html> (accessed 15 junio 2019).
51. Enciclopedia, T. E. o. t. B. Polyethylene Terephthalate (PET). <https://www.britannica.com/topic/industrial-polymers-468698/Polyesters#ref6477> (accessed 10 febrero 2019).
52. PET fibers  
[https://www.alibaba.com/product-detail/PET-bottles-recycled-polyester-staple-fiber\\_60287036235.html](https://www.alibaba.com/product-detail/PET-bottles-recycled-polyester-staple-fiber_60287036235.html) (accessed 15 junio 2019).
53. Botellas PET. <http://www.catalogodelempaque.com/ficha-producto/Botellas-PET+101005> (accessed 15 junio 2019).
54. Andrady, A. L., Microplastics in the marine environment. *Marine Pollution Bulletin*: 2011; pp 1596-1605.
55. Bannick, C. G.; Szewzyk, R.; Ricking, M.; Schniegler, S.; Obermaier, N.; Barthel, A. K.; Altmann, K.; Eisentraut, P.; Braun, U., Development and testing of a fractionated filtration for sampling of microplastics in water. *Water Research* **2019**, *149*, 650-658.
56. Serranti, S.; Palmieri, R.; Bonifazi, G.; Cozar, A., Characterization of microplastic litter from oceans by an innovative approach based on hyperspectral imaging. *Waste Management* **2018**, *76*, 117-125.
57. Hidalgo-Ruz, V.; Gutow, L.; Thompson, R. C.; Thiel, M., Microplastics in the Marine Environment: A Review of the Methods Used for Identification and Quantification *Environmental Science & Technology*: 2012; Vol. 46, pp 3060-3075.
58. Cooper, D. A.; Corcoran, P. L., Effects of mechanical and chemical processes on the degradation of plastic beach debris on the island of Kauai, Hawaii. *Marine Pollution Bulletin* **2010**, *60* (5), 650-654.
59. Kanhai, L. D. K.; Gardfelt, K.; Lyashevskaya, O.; Hassellöv, M.; Thompson, R. C.; O'Connor, I., Microplastics in sub-surface waters of the Arctic Central Basin. *Marine Pollution Bulletin*: 2018; pp 8-18.
60. Bessa, F.; Barria, P.; Neto, J.; Frias, J.; Otero, V.; Sobral, P.; Marques, J., Occurrence of microplastics in commercial fish from a natural estuarine environment. *Marine Pollution Bulletin* **2018**, *128*, 575-584.
61. Cole, M.; Webb, H.; Lindeque, P. K.; Fileman, E. S.; Halsband, C.; Galloway, T. S., Isolation of microplastics in biotrich seawater samples and marine organisms. *Scientific Reports* **2015**, *4* (1).
62. Neves, D.; Sobral, P.; Ferreira, J. L.; Pereira, T., Ingestion of microplastics by commercial fish off the Portuguese coast. **2015**, *101* (1), 119-126.
63. Ding, J. F.; Li, J. X.; Sun, C. J.; He, C. F.; Jiang, F. H.; Gao, F. L.; Zheng, L., Separation and Identification of Microplastics in Digestive System of Bivalves. *Chinese J. Anal. Chem.*: 2018; pp 690-697.
64. Browne, M. A.; Crump, P.; Niven, S. J. T., E. L.; Tonkin, A.; Galloway, T. T., R. C., Accumulations of microplastics on shorelines worldwide: sources and sinks. *Environmental Science and Technology*: 2011.
65. Peng, G.; Zhu, B.; Yang, D.; Su, L.; Shi, H.; Li, D., Microplastics in sediments of the Changjiang Estuary, China. *Environmental Pollution*: 2017; pp 283-290.
66. Hartline, N. L.; Bruce, N. J.; Karba, S. N.; Ruff, E. O.; Sonar, S. U.; Holden, P. A., Microfiber Masses Recovered from Conventional Machine Washing of New or Aged Garments. *Environmental Science & Technology* **2016**, *50* (21), 11532-11538.
67. Jonsson, C.; Arturin, O.; Hanning, A.; Landin, R.; Holmstrom, E.; Roos, S., Microplastics Shedding from Textiles-Developing Analytical Method for Measurement of Shed Material Representing Release during Domestic Washing. *Sustainability* **2018**, *10* (7).
68. Lebreton, L. Quantifying global plastic inputs from rivers into oceans. <https://www.theoceancleanup.com/updates/quantifying-global-plastic-inputs-from-rivers-into-oceans/> (accessed 4 febrero 2019).
69. Lebreton, L. C. M.; van der Zwet, J.; Damsteeg, J. W.; Slat, B.; Andrady, A.; Reisser, J., *River plastic emissions to the world's oceans*. *Nature Communications*: 2017.
70. Ng, K. L.; Obbard, J. P., Prevalence of microplastics in Singapore's coastal marine environment. *Marine Pollution Bulletin*: 2006; pp 761-767.
71. Schymanski, D.; Goldbeck, C.; Humpf, H. U.; Fürst, P., Analysis of microplastics in water by micro-Raman spectroscopy: Release of plastic particles from different packaging into mineral water. *Water Research*: 2018; pp 154-162.
72. Kooi, M.; Reisser, J.; Slat, B.; Ferrari, F. F.; Schmid, M. S.; Cunsolo, S.; Brambini, R.; Noble, K.; Sirks, L.-A.; Linders, T. E. W.; Schoeneich-Argeton, R. I.; Koelmans, A. A., The effect of particle properties on the depth profile of buoyant plastics in the ocean. **2016**, *6*, 33882.
73. Ryan, P. G., Does size and buoyancy affect the long-distance transport of floating debris? *Environmental Research Letters* **2015**, *10* (8), 084019.
74. Long, M.; Moriceau, B.; Gallinari, M.; Lambert, C.; huve, A.; Raffray, J. S., P., Interactions between microplastics and phytoplankton aggregates: Impact on their respective fates. *Marine Chemistry*: 2015; pp 39-46.
75. Fazey, F. M. C.; Ryan, P. G., Biofouling on buoyant marine plastics: An experimental study into the effect of size on surface longevity. **2016**, *210*, 354-360.
76. The Gold Book. <http://goldbook.iupac.org/html/C/C01172.html> (accessed 22 enero 2019).
77. Jungnickel, H.; Pund, R.; Tentschert, J.; Reichardt, P.; Laux, P.; Harbach, H.; Luch, A., Time-of-flight secondary ion mass spectrometry (ToF-SIMS)-based analysis and imaging of polyethylene microplastics formation during sea surf simulation. *Science of the Total Environment* **2016**, *563*, 261-266.

78. Pitt, J. A.; Trevisan, R.; Massarsky, A.; Kozal, J. S.; Levin, E. D.; Di Giulio, R. T., Maternal transfer of nanoplastics to offspring in zebrafish (*Danio rerio*): A case study with nanopolystyrene. *Science of the Total Environment*: 2018; pp 324-334.
79. Lusher, A. L.; McHugh, M.; Thompson, R. C., Occurrence of microplastics in the gastrointestinal tract of pelagic and demersal fish from the English Channel. *Marine Pollution Bulletin* **2013**, *67* (1-2), 94-99.
80. Budimir, S.; Setälä, O.; Lehtiniemi, M., *Effective and easy to use extraction method shows low numbers in microplastics in offshore planktivorous fish from the northern Baltic Sea*. *Marine Pollution Bulletin*: 2018; pp 568-592.
81. Halstead, J. E.; Smith, J. A.; Carter, E. A.; Lay, P. A.; L., J. E., Assessment tools for microplastics and natural fibres ingested by fish in an urbanised estuary. *Environmental Pollution*: 2017; pp 552-561.
82. Hermsen, E.; Pompe, R.; Besseling, E.; Koelmans, A., Detection of low numbers of microplastics in North Sea fish using strict quality assurance criteria. *Marine Pollution Bulletin* **2017**, *122* (1-2), 253-258.
83. Bråte, I. L. N.; Hurley, R.; Iversen, K.; Beyer, J.; Thomas, K. V.; Steindal, C. C.; Green, N. W.; Olsen, M.; Lusher, A., *Mytilus* spp. as sentinels for monitoring microplastic pollution in Norwegian coastal waters: A qualitative and quantitative study. *Environmental Pollution*: 2018; Vol. 243, pp 383-393.
84. Wright, S. L.; Rowe, D.; Thompson, R. C.; Galloway, T. S., Microplastic ingestion decreases energy reserves in marine worms. **2013**, *23* (23), R1031-R1033.
85. Digka, N.; Tsangaris, C.; Torre, M.; Anastasopoulou, A.; Zeria, C., Microplastics in mussels and fish from the Northern Ionian Sea. *Marine Pollution Bulletin*: 2018; pp 30-40.
86. Rochman, C. M.; Tahir, A.; Williams, S. L.; Baxa, D. V.; Lam, R.; Miller, J. T.; Teh, F.-C.; Werorilangi, S.; Teh, S. J., Anthropogenic debris in seafood: Plastic debris and fibers from textiles in fish and bivalves sold for human consumption. *Scientific Reports* **2015**, *5* (1), 14340.
87. Collard, F.; Gilbert, B.; Compère, P.; Eppe, G.; Das, K.; Jauniaux, T.; Parmentier, E., Microplastics in livers of European anchovies (*Engraulis encrasicolus*, L.) *Environmental Pollution*: 2017; pp 1000-1005.
88. Ghosal, S.; Chen, M.; Wagner, J.; Wang, Z.-M.; Wall, S., Molecular identification of polymers and anthropogenic particles extracted from oceanic water and fish stomach – A Raman micro-spectroscopy study. *Environmental Pollution* **2018**, *233*, 1113-1124.
89. Browne, M. A.; Niven, S. J.; Galloway, T. S.; Rowland, S. J.; Thompson, R. C., Microplastic Moves Pollutants and Additives to Worms, Reducing Functions Linked to Health and Biodiversity. *Current Biology*: 2013; pp 2388-2392.
90. Granby, K.; Rainieri, S.; Rasmussen, R. R.; Kotterman, M. J. J.; Sloth, J. J.; Cederberg, T. L.; Barranco, A.; Marques, A.; Larsen, B. K., The influence of microplastic and halogenated contaminants in feed on toxicokinetics and gene expression in European seabass (*Dicentrarchus labrax*). *Environmental Research*: 2018; pp 430-443.
91. Rochman, C. M.; Kurobe, T.; Flores, I.; Teh, S. J., Early warning signs of endocrine disruption in adult fish from the ingestion of polyethylene with and without sorbed chemical pollutants from the marine environment. *Science of The Total Environment* **2014**, *493*, 656-661.
92. Pitt, J. A.; Kozal, J. S.; Jayasundara, N.; Massarsky, A.; Trevisan, R.; Geitner, N.; Wiesner, M.; Levin, E. D.; Di Giulio, R. T., Uptake, tissue distribution, and toxicity of polystyrene nanoparticles in developing zebrafish (*Danio rerio*). *Aquatic Toxicology* **2018**, *194*, 185-194.
93. Tallec, K.; Huvet, A.; Di Poi, C.; González Fernández, C.; Lambert, C.; Petton, B.; Le Goïc, N.; Berchel, M.; Soudant, P.; Paul-Pont, I., Nanoplastics impaired oyster free living stages, gametes and embryos. *Environmental Pollution*: 2018; pp 1226-1235.
94. Zhang, H.; Wang, J.; Zhou, B.; Zhou, Y.; Dai, Z.; Zhou, Q.; Christie, P.; Luo, Y., Enhanced adsorption of oxytetracycline to weathered microplastic polystyrene: Kinetics, isotherms and influencing factors. *Environmental Pollution*: 2018; pp 1550-1557.
95. Presence of microplastics and nanoplastics in food, with particular focus on seafood. *EFSA Journal* **2016**, *14* (6), e04501.
96. Rist, S.; Carney Almroth, B.; Hartmann, N. B.; Karlsson, T. M., A critical perspective on early communications concerning human health aspects of microplastics. *Science of The Total Environment* **2018**, *626*, 720-726.
97. Microplásticos y Nanoplásticos. [http://www.aecosan.msssi.gob.es/AECOSAN/web/seguridad\\_alimentaria/ampliacion/microplasticos\\_nanoplásticos.htm](http://www.aecosan.msssi.gob.es/AECOSAN/web/seguridad_alimentaria/ampliacion/microplasticos_nanoplásticos.htm) (accessed 16 junio 2019).
98. ECHA proposes to restrict intentionally added microplastics. <https://echa.europa.eu/es/-/echa-proposes-to-restrict-intentionally-added-microplastics> (accessed 16 junio 2019).
99. Hollman, P. C. H.; Bouwmeester, H.; Peters, R. J. B. *Microplastics in the aquatic food chain. Sources, Measurement, occurrence and potential health risks*; Rikilt Wageningen: Wageningen, 2013.
100. Bergman, A.; Heindel, J. J.; Jobling, S.; Kidd, K. A.; Zoeller, R. T., *State of the Science of Endocrine Disrupting Chemicals*. 2012.
101. *directiva 94/62/CE del Parlamento Europeo y del Consejo de 20 de diciembre de 1994 relativa a los envases y residuos de envases*. Diario Oficial de las Comunidades Europeas: 1994.
102. *Directive 2008/56/EC of the European Parliament and of the Council of June 2008 establishing a framework for community action in the field of Marine Environmental Policy (Marine Strategy Framework Directive)*. Official Journal of the European Union, 2008.
103. Galgani, F.; Hanke, G.; Werner, S.; De Vrees, L., *Marine litter within the European Marine Strategy Framework Directive*. ICES Journal of Marine Science: 2013; pp 1055-1064.
104. *Our Oceans, Seas and Coasts*. [http://ec.europa.eu/environment/marine/international-cooperation/regional-sea-conventions/index\\_en.htm](http://ec.europa.eu/environment/marine/international-cooperation/regional-sea-conventions/index_en.htm) (accessed 17 febrero 2019).
105. *New proposal will tackle marine litter and "ghost fishing"*. [https://ec.europa.eu/fisheries/new-proposal-will-tackle-marine-litter-and-%E2%80%9Cghost-fishing%E2%80%9D\\_en](https://ec.europa.eu/fisheries/new-proposal-will-tackle-marine-litter-and-%E2%80%9Cghost-fishing%E2%80%9D_en) (accessed 16 febrero 2019).
106. *Reglamento (CE) nº 1224/2009 del Consejo de 20 de noviembre de 2009 por el que se establece un régimen comunitario para garantizar el cumplimiento de las normas de la política pesquera común*. Diario Oficial de la Unión Europea: 2009.
107. *Propuesta de Directiva del Parlamento Europeo y del Consejo relativa a las instalaciones portuarias receptoras a efectos de la entrega de desechos de buques*. 2018.
108. *Reglamento (UE) Nº10/2011 de la Comisión de 14 de enero 2011 sobre materiales y objetos plásticos destinados a entrar en contacto con alimentos*. Diario Oficial de la Unión Europea.: 2011.
109. *Directiva (UE) 2015/720 del Parlamento Europeo y del Consejo de 29 de abril de 2015 por la que se modifica la Directiva 94/62/CE en lo que se refiere a la reducción del consumo de bolsas de plástico ligeras*. Diario Oficial de la Unión Europea: 2015.

110. Kass, G.; Moon, J.; Robinson, T. *Horizon 2020: EFSA's Priority Research Topics*; EFSA: 2017.
111. ICES, ICES Special Request Advice Northeast Atlantic and Arctic Ocean. OSPAR request on development of a common monitoring protocol for plastic particles in fish stomachs and selected shellfish on the basis of existing fish disease surveys. ICES Advice 2015: 2015; Vol. Book I (June), pp 1,6.
112. Kunz, A.; Walter, B. A.; Löwermark, L.; Lee, Y. C., Distribution and quantity of microplastic on sandy beaches along the northern coast of Taiwan. *Marine Pollution Bulletin*: 2016; pp 126-135.
113. Phuong, N.; Poirier, L.; Lagarde, F.; Kamari, A.; Zalouk-Vergnoux, A., Microplastic abundance and characteristics in French Atlantic coastal sediments using a new extraction method. *Environmental Pollution* **2018**, *243*, 228-237.
114. Simon, M.; van Alst, N.; Vollersten, J., Quantification of microplastic mass and removal rates at wastewater treatment plants applying Focal Plane Array (FPA)-based Fourier Transform Infrared (FT-IR) imaging. *Water Research*: 2018; pp 1-9.
115. Song, Y. K.; Hong, S. H.; Jang, M.; Han, G. M.; Rani, M.; Lee, J.; Shim, W. J., A comparison of microscopic and spectroscopic identification methods for analysis of microplastics in environmental samples. *Marine Pollution Bulletin*: 2015; pp 202-209.
116. Nuelle, M.-T.; Dekiff, J. H.; Remy, D.; Fries, E., A new analytical approach for monitoring microplastics in marine sediments. *Environmental Pollution* **2014**, *184*, 161-169.
117. Löder, M. G. J.; Gerdts, G., *Methodology Used for the Detection and Identification of Microplastics—A Critical Appraisal*. Springer International Publishing: 2015; pp 201-227.
118. Prata, J. C.; da Costa, J. P.; Duarte, A. C.; Rocha-Santos, T., Methods for sampling and detection of microplastics in water and sediment: a critical review. *Trends in Analytical Chemistry*: 2018.
119. Gago, J.; Galgani, F.; Maes, T.; Thompson, R. C., Microplastics in Seawater: Recommendations from the Marine Strategy Framework Directive Implementation Process. *Frontiers in Marine Science* **2016**, *3*.
120. Administration, N. O. a. A. CTD. <https://oceanexplorer.noaa.gov/facts/ctd.html> (accessed 24 febrero 2019).
121. Löder, M. G. J.; Kuczer, M.; Mintenig, S.; Iorenz, C.; Gerdts, G., *Focal plane array detector-based micro-Fourier-transform infrared imaging for the analysis of microplastics in environmental samples*. *Environ. Chem.*: 2015; pp 563-581.
122. Zhou, Q.; Zhang, H.; Fu, C.; Zhou, Y.; Dai, Z.; Li, Y.; Tu, C.; Luo, Y., The distribution and morphology of microplastics in coastal soils adjacent to the Bohai Sea and the Yellow Sea. *Geoderma* **2018**, *322*, 201-208.
123. Besley, A.; Vijver, M. G.; Behrens, P.; Bosker, T., A standardized method for sampling and extraction methods for quantifying microplastics in beach sand. **2016**.
124. Fries, E.; Dekiff, J. H.; Willmeyer, J.; Nuelle, M. T.; Ebert, M.; Remy, D., Identification of polymer types and additives in marine microplastic particles using pyrolysis-GC/MS and scanning electron microscopy. *Environ. Sci.: Processes Impacts*: 2013; pp 1949-1956.
125. Lusher, A. L.; Welden, N. A.; Sobral, P.; Coled, M., Sampling, isolating and identifying microplastics ingested by fish and invertebrates. *Analytical Methods*: 2017; pp 1346-1360.
126. Masura, J.; Baker, J.; Foster, G.; Arthur, C., *Laboratory Methods for the Analysis of Microplastics in the Marine Environment*. National Oceanic and Atmospheric Administration: 2015.
127. Litter, M. T. S. o. M., *Guidance on Monitoring of Marine Litter in European Seas*. Joint Research Centre of the European Commission: 2013.
128. Herrera, A.; Garrido Amador, P.; Martínez, I.; Samper, M. D.; López Martínez, J.; Gómez, M.; Packard, T. T., Novel methodology to isolate microplastics from vegetal-rich samples. *Marine Pollution Bulletin*: 2018; pp 61-69.
129. Dehaut, A.; Cassone, A. L.; Frère, L.; Hermabessiere, L.; Himber, C.; Rinnert, E.; Rivière, G.; Lambert, C.; Soudant, P.; Huvet, A.; Duflos, G.; Paul-Pont, I., Microplastics in seafood: Benchmark protocol for their extraction and characterization. *Environmental Pollution*: 2015; pp 223-233.
130. Collard, F.; Gilbert, B.; Eppe, G.; Parmentier, E.; Das, K., Detection of anthropogenic particles in fish stomachs: an isolation method adapted to identification by Raman spectroscopy. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.*, 2015; pp 331-339.
131. Fuller, S.; Gautam, A., A Procedure for Measuring Microplastics using Pressurized Fluid Extraction. *Environmental Science & Technology* **2016**, *50* (11), 5774-5780.
132. Boerger, C. M.; Lattin, G. L.; Moore, S. L.; Moore, C. J., Plastic ingestion by planktivorous fishes in the North Pacific Central Gyre. *Marine Pollution Bulletin* **2010**, *60* (12), 2275-2278.
133. Caron, A. G. M.; Thomas, C. R.; Berry, K. L. E.; Motti, C. A.; Ariel, E.; Brodie, J. E., Validation of an optimised protocol for quantification of microplastics in heterogeneous samples: A case study using green turtle chyme. *MethodsX*: 2018; pp 812-823.
134. Mathalon, A.; Hill, P., Microplastic fibers in the intertidal ecosystem surrounding Halifax Harbor, Nova Scotia. *Marine Pollution Bulletin*: 2014; Vol. 81, pp 69-79.
135. Enders, K.; Lenz, R.; Beer, S.; Stedmon, C. A., Extraction of microplastic from biota: recommended acidic digestion destroys common plastic polymers. *ICES Journal of Marine Science: Journal du Conseil* **2016**, fsw173.
136. Dehaut, A.; Hermabessiere, L.; Duflos, G., Current frontiers and recommendations for the study of microplastics in seafood. *Trends in Analytical Chemistry*: 2018.
137. Avio, C. G.; Gorb, S.; Regoli, F., Experimental development of a new protocol for extraction and characterization of microplastics in fish tissues: First observations in commercial species from Adriatic Sea. *Marine Environmental Research* **2015**, *111*, 18-26.
138. Maher, W.; Krikowa, F.; Wruck, D.; Louie, H.; Nguyen, T.; Huang, W. Y., Determination of total phosphorus and nitrogen in turbid waters by oxidation with alkaline potassium peroxodisulfate and low pressure microwave digestion, autoclave heating or the use of closed vessels in a hot water bath: comparison with Kjeldahl digestion. **2002**, *463* (2), 283-293.
139. Foekema, E. M.; De Gruijter, C.; Mergia, M. T.; van Franeker, J. A.; Murk, A. J.; Koelmans, A. A., Plastic in North Sea Fish. *Environmental Science & Technology* **2013**, *47* (15), 8818-8824.
140. Zobkov, M.; Esiukova, E., Microplastics in Baltic bottom sediments: Quantification procedures and first results. *Marine Pollution Bulletin*: 2017; pp 724-732.
141. Lenz, R.; Enders, K.; Stedmon, C. A.; Mackenzie, D. M. A.; Nielsena, T. G., A critical assessment of visual identification of marine microplastic using Raman spectroscopy for analysis improvement. *Marine Pollution Bulletin*: 2015; pp 82-91.
142. Harrison, J. P.; Ojeda, J. J.; Romero-González, M. E., The applicability of reflectance micro-Fourier-transform infrared spectroscopy for the detection of synthetic microplastics in marine sediments. *Science of the Total Environment*: 2012; pp 455-463.
143. Ul-Hamid, A., *A Beginners' Guide to Scanning Electron Microscopy*. Springer: 2018.
144. Wang, Z. M.; Wagner, J.; Ghosal, S.; Bedi, G.; Wall, S., SEM/EDS and optical microscopy analyses of microplastics in ocean trawl and fish guts. *Science of the Total Environment*: 2017; pp 616-626.

145. Maes, T.; Jessop, R.; Wellner, N.; Haupt, K.; Mayes, A. G., A rapid-screening approach to detect and quantify microplastics based on fluorescent tagging with Nile Red. *Scientific Reports* **2017**, *7* (1), 44501.
146. Shim, W. J.; Song, Y. K.; Hong, S. H.; Jang, M., Identification and quantification of microplastics using Nile Red staining. **2016**.
147. Manzano Agugliaro, F.; Garrido Cárdenas, J. A.; Jiménez Caminero, E., *Técnicas de investigación avanzadas en Agronomía y ciencias afines*. Universidad de Almería: 2018.
148. Skoog, D. A.; West, D. M., *Principles of Instrumental Analysis*. 2 ed.; Saunders College: 1980.
149. Bradley, M. FTIR Sample techniques - Transmission. <https://www.thermofisher.com/ae/en/home/industrial/spectroscopy-elemental-isotope-analysis/spectroscopy-elemental-isotope-analysis-learning-center/molecular-spectroscopy-information/ftir-information/ftir-sample-handling-techniques/ftir-sample-handling-techniques-transmission.html> (accessed 18 febrero 2019).
150. Bradley, M. FTIR Sample techniques: True Specular Reflectance/reflection Absorption. <https://www.thermofisher.com/ae/en/home/industrial/spectroscopy-elemental-isotope-analysis/spectroscopy-elemental-isotope-analysis-learning-center/molecular-spectroscopy-information/ftir-information/ftir-sample-handling-techniques/ftir-sample-handling-techniques-true-specular-reflectance-reflection-absorption.html> (accessed 18 febrero 2019).
151. Bradley, M. FTIR Sample techniques: Attenuated Total Reflection (ATR). <https://www.thermofisher.com/ae/en/home/industrial/spectroscopy-elemental-isotope-analysis/spectroscopy-elemental-isotope-analysis-learning-center/molecular-spectroscopy-information/ftir-information/ftir-sample-handling-techniques/ftir-sample-handling-techniques-attenuated-total-reflection-atr.html> (accessed 18 febrero 2019).
152. Bradley, M. FTIR Sample Techniques - Diffuse Reflectance (DRIFTS). <https://www.thermofisher.com/ae/en/home/industrial/spectroscopy-elemental-isotope-analysis/spectroscopy-elemental-isotope-analysis-learning-center/molecular-spectroscopy-information/ftir-information/ftir-sample-handling-techniques/ftir-sample-handling-techniques-diffuse-reflectance-drifts.html> (accessed 18 febrero 2019).
153. SR-FTIR Endstation. <http://www.esrf.eu/home/UsersAndScience/Experiments/XNP/ID21/SrFtir.html> (accessed 6 febrero 2019).
154. Wang, M.; Lu, X.; Yin, X.; Tong, Y.; Peng, W.; Wu, L.; Li, H.; Yang, Y.; Gu, J.; Xiao, T.; Chen, M.; Zhang, J., Synchrotron radiation-based Fourier-transform infrared spectromicroscopy for characterization of the protein/peptide distribution in single microspheres. **2015**, *5* (3), 270-276.
155. Turell, G.; Corset, J., *Raman microscopy. Developments and Applications*. Elsevier Academic Press: San Diego, California, USA, 1996.
156. What is Raman Spectroscopy? <https://www.nanophoton.net/raman/raman-spectroscopy.html> (accessed 21 marzo 2019).
157. Anger, P. M.; von der Esch, E.; Baumann, T.; Elsner, M.; Niessner, R.; Ivleva, N. P., Raman microspectroscopy as a tool for microplastic particle analysis. *Trends in Analytical Chemistry*: 2018; pp 214-226.
158. Araujo, C. F.; Nolasco, M. M.; Ribeiro, A. M. P.; Ribeiro-Claro, P. J. A., Identification of microplastics using Raman spectroscopy: Latest developments and future prospects. *Water Research*: 2018; pp 426-440.
159. Arroyo-Pieck, A.; Peón, J., Premio Nobel de Química 2014 Microscopía de fluorescencia con super-resolución. **2015**, *26* (1), 50-51.
160. Oßmann, B. E.; Sarau, G.; Holtmannspötter, H.; Pischetsrieder, M.; Christiansen, S. H.; Dicke, W., Small-sized microplastics and pigmented particles in bottled mineral water. *Water Research* **2018**, *141*, 307-316.
161. L., F.; I., P.-P.; J., M.; P., S.; C., L.; A., H.; E., R., A semi-automated Raman micro-spectroscopy method for morphological and chemical characterizations of microplastic litter. *Marine Pollution Bulletin*: 2016; pp 461-468.
162. Hindenlang, D. M.; Sedgwick, R. D., *Comprehensive Polymer Science*. Pergamon: 1996.
163. Niaounakis, M., *Management of Marine Plastic Debris. Prevention, Recycling and Waste Management*. Elsevier: 2017.
164. Basu, P., *Biomass Gasification, Pyrolysis and Teorrefaction*. Academic Press: 2018.
165. Fabbri, D.; Tartari, D.; Trombini, C., Analysis of poly(vinyl chloride) and other polymers in sediments and suspended matter of a coastal lagoon by pyrolysis-gas chromatography-mass spectrometry. *Analytica Chimica Acta* **2000**, *413* (1-2), 3-11.
166. Dumichen, E.; Eisentraut, P.; Bannick, C.; Barthel, A.; Senz, R.; Braun, U., Fast identification of microplastics in complex environmental samples by a thermal degradation method. *Chemosphere* **2017**, *174*, 572-584.
167. Kühn, S.; van Oyen, A.; Booth, A. M.; Meijboom, A.; van Franeker, J. A., Marine microplastic: Preparation of relevant test materials for laboratory assessment of ecosystem impacts. *Chemosphere*: 2018; pp 103-113.
168. Lanctot, C. M.; Al-Sid-Cheikh, M.; Catarino, A. I.; Cresswell, T.; Danis, B.; Karapanagioti, H. K.; Mincer, T.; Oberhänsli, F.; Swarzenski, P.; Tolosa, I.; Metian, M., Application of nuclear techniques to environmental plastic research. *Journal of Environmental Radioactivity*: 2018; pp 368-375.
169. Dieing, T.; Hollricher, O., High-resolution, high-speed confocal Raman imaging. **2008**, *48* (1), 22-27.