

TRABAJO FINAL DE MÁSTER

# La espectroscopía como herramienta analítica para evaluar el papel de los microplásticos en la contaminación ambiental y la química forense

---

**EVA FERRER LOMBARTE**

Máster en Genética, Física y Química Forense

**Tutora universidad URV:** Maria Soledad Larrechi García

**Tutora universidad UAH:** Gemma Montalvo García

**Tarragona:** junio 2021

## ÍNDICE

<b>RESUMEN</b> .....	<b>3</b>
<b>ABSTRACT</b> .....	<b>4</b>
<b>1. INTRODUCCIÓN</b> .....	<b>5</b>
<b>2. OBJETIVOS</b> .....	<b>9</b>
<b>3. FUNDAMENTOS TEÓRICOS</b> .....	<b>10</b>
3.1. Espectroscopía del infrarrojo cercano .....	10
3.1.1. Interpretación de los espectros IR.....	11
3.2. Espectroscopía de Raman .....	12
3.2.1. Espectroscopía de Raman Mejorada (SERS) .....	12
3.3. Comparación espectroscopía del infrarrojo / espectroscopía de Raman.....	13
3.4. Técnica ICP-OES .....	13
<b>4. PARTE EXPERIEMETAL</b> .....	<b>14</b>
4.1. Microplásticos analizados .....	14
4.2. Formación de biopelículas .....	15
4.3. Adsorción de los metales Cu (II) y Zn (II) en los microplásticos en estudio. ....	17
4.4. Muestras obtenidas. ....	18
4.5. Condiciones de las medidas espectrales.....	19
4.5.1. Espectroscopía de infrarrojos.....	19
4.5.2. Espectroscopía Raman.....	20
4.5.3. Espectroscopía Raman Mejorada. ....	20
4.6. Condiciones técnicas ICP-OES .....	21
<b>5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN</b> .....	<b>22</b>
5.1. Espectro IR de los microplásticos iniciales.....	22
5.2. Espectro IR del Microplástico blanco y azul modificado después de la formación de la biopelícula.....	23
5.3. Espectro IR del microplástico blanco y azul tras la recuperación. ....	24
5.4. Espectro Raman de los Microplásticos iniciales.....	25
5.5. Espectro Raman del Microplástico blanco y azul modificado después de la formación de la biopelícula.....	26
5.6. Espectro Raman del microplástico blanco y azul tras la recuperación. ....	27
5.7. Espectro Raman del Microplástico azul modificado después de la formación de la biopelícula (SERS). 28	
5.8. Capacidad de adsorción de los metales a los microplásticos. ....	29
<b>6. CONCLUSIONES</b> .....	<b>30</b>
<b>7. BIBLIOGRAFÍA</b> .....	<b>31</b>

## RESUMEN

Recientemente, muchos contaminantes como los residuos plásticos se han vuelto de interés entre los científicos forenses ambientales. El uso del plástico se ha convertido en un problema para la existencia de formas de vida tanto acuática como terrestre debido al gran aumento de los desechos. En este estudio, se investigaron mediante técnicas vibracionales como infrarrojo y Raman y técnicas de espectroscopía atómica las posibles adsorciones de la *Pseudomona aeruginosa* (microorganismo) y metales pesados de Cu(II) y Zn (II) a dos microplásticos, uno blanco y otro azul formado ambos por polietileno.

Se evidenció que la estructura del microplástico tenía la capacidad de adherir microorganismos y generar una biopelícula sobre su superficie, aunque estas interacciones son débiles, ya que tras varios lavados se recupera el microplástico inicial. Por otro lado, también tienen la capacidad de adsorber metales pesados en porcentajes bajos. La adsorción del  $\text{Cu}^{2+}$  en el microplástico blanco es superior que en el microplástico azul, mientras que la adsorción de  $\text{Zn}^{2+}$  es justo lo contrario.

Palabras clave: Microplásticos, bacteria, formación de biofilm, metales pesados, infrarrojo, Raman y espectroscopía atómica.

## ABSTRACT

Recently, many pollutants such as plastic waste have become of interest to environmental forensic scientists. The use of plastic has become a problem for the existence of both aquatic and terrestrial life forms due to the large increase in waste. In this study, the possible adsorption of *Pseudomonas aeruginosa* (microorganism) and heavy metals of Cu (II) and Zn (II) to two microplastics, one white and the other blue, both formed by polyethylene, were investigated. Using vibrational techniques such as infrared and Raman and atomic spectroscopy techniques.

It was discovered that the structure of the microplastic had the ability to adhere microorganisms and generate a biofilm on its surface, although these interactions are weak, since after several washes the initial microplastic is recovered. On the other hand, they also can adsorb heavy metals in low percentages.  $\text{Cu}^{2+}$  adsorption on white microplastic is higher than on blue microplastic, while  $\text{Zn}^{2+}$  adsorption is just the opposite.

Keywords: microplastics, bacteria, biofilm formation, heavy metals, infrared, Raman, and atomic spectroscopy

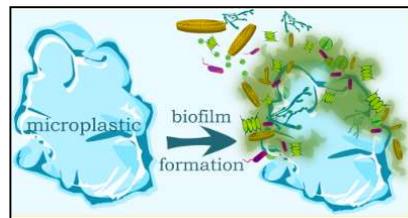
## 1. INTRODUCCIÓN

La ciencia forense ambiental implica la investigación de una diversa gama de contaminantes que han sido accidental o deliberadamente liberados en el medio ambiente[1]. Recientemente, emergentes contaminantes como los residuos plásticos se han vuelto de interés entre los científicos forenses ambientales. Los plásticos han revolucionado nuestra vida diaria y han proporcionado beneficios significativos para muchas industrias; sin embargo, aunque los beneficios han sido inmensos no cabe duda de que el plástico se ha convertido en un problema medioambiental, lo que ha dado lugar a que sea clasificado como residuo peligroso. El alcance de este tipo de contaminación es enorme; mucho mayor que otros contaminantes que normalmente son investigados por científicos forenses ambientales. El uso globalizado del plástico se debe principalmente al bajo coste de producción y en la actualidad se ha convertido en una maldición para la existencia de formas de vida tanto acuática como terrestre debido al gran aumento de los desechos plásticos en el medio ambiente[2]. Solo del 9% al 12% de plástico fue reciclado; y el 79% se vertió en el medio natural o los vertederos[1].

Con los microplásticos (MPs) (plásticos que tienen un tamaño inferior a 5 mm)[2][3], la contaminación se ha convertido en una preocupación mundial debido a su posible entrada en la cadena alimentaria y se pueden encontrar tanto en el aire como en ecosistemas acuáticos y terrestres [4]. Los microplásticos se liberan en nuestros entornos a través de una variedad de mecanismos, incluyendo la liberación accidental y deliberada de desechos plásticos[1]. Fuentes primarias (aquellas que han sido fabricadas en este pequeño tamaño, por ejemplo, microperlas en los productos cosméticos) y las fuentes secundarias (formadas por la degradación de plásticos más grandes) se transportan fácilmente entre ambientes. Por ejemplo, se liberan fibras sintéticas a la atmósfera a través del uso y secado de la ropa, en ambientes acuáticos a través del lavado y en nuestros entornos terrestres a través de lodos de depuradora de plantas de tratamiento de aguas residuales.

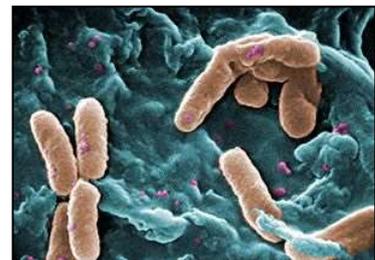
Una vez en los ecosistemas marinos, los microplásticos se transportan de manera eficiente a través de los océanos y mares y muchos estudios han informado de su presencia en todos los posibles compartimentos como aguas, sedimentos y biota [5]. El principal problema es la adsorción de sustancias químicas tóxicas en los poros de los MPs, actualmente se sabe que los MPs pueden actuar como un imán para las sustancias químicas tóxicas presentes en el entorno circundante y pueden transportarse dentro del sistema acuático o terrestre [4].

A modo de ejemplo, en la figura 1 se pueden observar cómo los microorganismos tienden a adherirse, ensamblarse, proliferar y formar biopelículas en las superficies del huésped dependiendo de las condiciones ambientales. Estos entran en contacto con la superficie de los MPs por interacciones repulsivas y atractivas entre la superficie, pared celular y el medio [6].



**Figura 1. Formación de la biopelícula.** (Impacts of Biofilm Formation on the Fate and Potential Effects of Microplastic in the Aquatic Environment)

La biopelícula es un sistema complejo que incluye células microbianas y sustancias poliméricas extracelulares (EPS) compuestas principalmente por proteínas, carbohidratos, lípidos y material genético [7]. En este estudio se utilizó la bacteria *Pseudomona aeruginosa* como se puede ver en la figura 2, es una bacteria Gram-negativa. Las bacterias del género *Pseudomonas* son muy ubicuas y se encuentran en suelos, aguas, y ambientes intrahospitalarios. La *Pseudomona aeruginosa* crece entre 10 y 42°C y se encuentra muy repartida[8]. Cuando esta bacteria entra en contacto con las matrices poliméricas forma biopelículas donde las



**Figura 2. Pseudomona Aeruginosa** (<https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Pseudomonas.jpg>)

células bacterianas se incrustan en la matriz y tienen la capacidad de degradar y oxidar al polímero. Por lo tanto, la formación de biopelículas podría cambiar la estructura y las funciones de la comunidad microbiana dentro y entre las comunidades microbianas existentes. También es importante destacar que la formación de biopelículas podría afectar a la flotabilidad de los microplásticos, afectando así su tasa de hundimiento y posible distribución en el medio acuático. Además, las biopelículas causan daños estructurales y funcionales a los microplásticos, enmascaran las propiedades de la superficie, descargan subproductos metabólicos y degradan aditivos (incluidos metales y contaminantes orgánicos persistentes adsorbidos por los microplásticos)[4].

La identificación de la composición de esta biopelícula es muy importante para aclarar las interacciones entre el medio ambiente y el crecimiento microbiano y también para comprender la dinámica molecular de la biopelícula con su propio sistema. El análisis de biopelículas se puede realizar con diferentes técnicas de microscopía y espectroscopía molecular, y también con técnicas vibracionales como el infrarrojo y Raman para obtener información sobre la estructura del biofilm a nivel molecular. Estas dos son técnicas de espectroscopia vibracional que se complementan entre sí para adquirir la suficiente información espectral sobre la estructura molecular de las biopelículas [9].

Esta capacidad de los microplásticos de actuar como vectores de otros contaminantes es lo que pone en el punto de mira en las investigaciones de interacción entre microplásticos con microorganismos como pueden ser la bacteria *Pseudomona Aeruginosa*.

Otro problema importante, es que los microplásticos, aparte de absorber contaminantes orgánicos persistentes, también pueden adsorber metales pesados del agua y de los sedimentos, además cada MPs puede comportarse de manera diferente [10]. Por lo tanto, la concentración de metales y las condiciones de adsorción serán tan amplias como la variedad de microplásticos usados, fibras, esferas, fragmentos de tamaños diversos, o de distintas características fisicoquímicas según sea el polímero del que estén hechos.

En la figura 3 se observa como los microplásticos tienen la capacidad de degradarse e interactuar con metales tóxicos o con microorganismos, generando así un proceso de contaminación al medio ambiente.

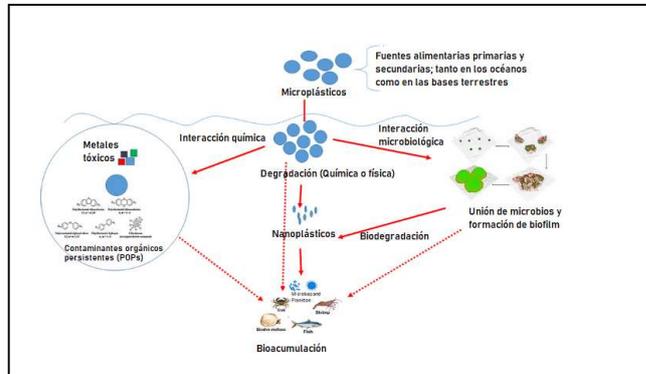


Figura 3. Degradación de los microplásticos y sus interacciones. Causa de contaminación. [4].

Para ello es importante conocer la capacidad en la que se puede producir dicha adsorción. En este trabajo, se realizará un estudio de los microplásticos y su adsorción a microorganismos y metales pesados mediante las técnicas de espectroscopía vibracional de infrarrojo y Raman y espectroscopía atómica.

Varios trabajos científicos han realizado estudios sobre esta temática, en la mayoría han utilizado microplásticos formados por polietileno (PE), polipropileno (PP) y poliestireno (PS) y microorganismos como la *Pseudomona aeruginosa*, la *staphylococcus epidermidis* y *cándida albicans*[7],[9] aunque otros estudios han utilizado bacterias como la *Brevundimonas diminuta*, la *Escherichia coli*, la *Pseudomona pútida* o el *bacilius subtilis* (gram-positivo)[11][12][13]. Todos ellos realizaron el estudio mediante técnicas vibracionales de infrarrojo y Raman mejorado (SERS), con el objetivo de determinar la capacidad de adsorción de estos contaminantes a los microplásticos.

## 2. OBJETIVOS

El objetivo principal, es estudiar la interacción de diferentes microplásticos con contaminantes ambientales y con los microorganismos existentes en el sistema terrestre y acuático, para conocer así su capacidad de adsorción. Este proyecto se centrará en el estudio de la posible adsorción de la bacteria *Pseudomona aeruginosa* con dos microplásticos uno blanco y otro azul formado ambos por polietileno. Se seleccionaron estos en concreto porque son los más utilizados por los consumidores y, por otro lado, la posible adsorción de diferentes metales pesados.

Para ello hay que poner en evidencia que las técnicas utilizadas sirven para determinar la emergente contaminación en un caso forense, ya que estos microplásticos suelen acabar retenidos en lodos de aguas residuales.

Aunque se especifican los objetivos del trabajo, por otro lado, la parte que quiero enfatizar es muy formativa para mí y se puede considerar como un objetivo más. Por un lado, me refiero al trabajo bibliográfico que he realizado y por otro, a las discusiones con mi tutora y grupo de investigación de la Universidad de Alcalá. Estas discusiones no solo me proporcionan una parte experimental guiada si no también me permiten ver la visualización del papel de la química en el campo de la ciencia forense.

### 3. FUNDAMENTOS TEÓRICOS.

Debido a que, en este trabajo se requieren tomar espectros por la técnica de espectroscopia, se darán a conocer los principios y la teoría básica necesaria que nos ayudará a entender y comprender los conceptos que se estarán utilizando. Además, también se hizo un estudio cuantitativo sobre la cantidad de metales adsorbidos en los microplásticos.

#### 3.1. Espectroscopía del infrarrojo cercano

La espectroscopia molecular se basa principalmente en la interacción entre la radiación electromagnética existente y las moléculas. Dependiendo de la región del espectro en la que se trabaje, esta interacción será de diferente naturaleza, podrá ser por excitación de electrones, vibraciones o rotaciones moleculares. La molécula cuando adsorbe la radiación infrarroja ( $\lambda=700 \text{ nm} - 1 \text{ mm}$ ), cambia su estado de energía vibracional y rotacional. No todas las vibraciones posibles se pueden detectar, solo se perciben las que impliquen un cambio en su momento dipolar. El espectro infrarrojo de una muestra se registra pasando un haz de luz infrarroja a través de la muestra. Cuando la frecuencia del IR es la misma que la frecuencia vibratoria de un enlace o colección de enlaces, se produce la absorción. El examen de la luz transmitida revela cuánta energía se absorbió en cada longitud de onda [14],[15].

Otro concepto importante es el de la reflectancia total atenuada (ATR), esta medida se basa en el fenómeno de la reflexión total y la transmisión de luz a través de un cristal con un elevado índice de refracción. Esta radiación penetra más allá de la superficie de la muestra en la cual se produce la reflexión total. La luz que viaja se verá atenuada y se puede registrar el espectro de la muestra. Dado que la ATR permite medir los espectros sin tener que preparar muestras ni usar diluciones, se puede aplicar para el análisis de materiales sólidos y líquidos. Además, esta técnica no es destructiva, por lo que la

muestra puede volver a ser utilizada y eso es una gran ventaja en casos forenses, donde es importante preservar la muestra. Uno de los primeros usos de la ATR fue obtener los espectros infrarrojos de películas y muestras de polímeros [16].

### 3.1.1. Interpretación de los espectros IR

Los espectros que se registran mediante la técnica IR exhiben una serie de bandas de adsorción características de los grupos funcionales que proporcionan información de la naturaleza físico-química de la muestra analizada [15]. En la tabla 1, a modo de resumen se han recogido los valores a los que pertenecen las vibraciones de los grupos -CH, N-H, C=N, C=O, C=C y N=N presentes en las muestras analizadas.

Tabla 1. Asignación de enlaces[17].

Grupo funcional/vibración	Región
$\nu(\text{C-C})$ alicíclico	$<1000 \text{ cm}^{-1}$
$\nu(\text{C-N})$	$1200-1300 \text{ cm}^{-1}$
$\nu(\text{C=C})$ aromáticas	$1480-1600 \text{ cm}^{-1}$
$\delta(-\text{CH}_3)$	$1380 \text{ cm}^{-1}$
$\delta(-\text{CH}_2)$ $\delta(-\text{CH}_3)$ asimétrica	$1400-1470 \text{ cm}^{-1}$
$\nu(\text{N=N})$	$1480-1500 \text{ cm}^{-1}$
$\delta(\text{N-H})$	$1550-1640 \text{ cm}^{-1}$
$\nu(\text{C=O})$	$1630-1680 \text{ cm}^{-1}$
$\nu(\text{C=N})$	$1610-1680 \text{ cm}^{-1}$
$\nu(\text{C=C})$	$1500-1900 \text{ cm}^{-1}$
$\nu(\text{C-H})$	$2800-3000 \text{ cm}^{-1}$
$\nu(\text{N-H})$	$3200-3600 \text{ cm}^{-1}$

Conocer las vibraciones de los enlaces será útil para determinar la interacción de la bacteria con el microplástico. Al formarse dicha interacción y por lo tanto la posible adsorción aparecerán nuevas bandas, incremento de estas o incluso desplazamientos.

### 3.2. Espectroscopía de Raman

La espectroscopia Raman es el estudio de la interacción entre la radiación electromagnética y la materia, en esta interacción hay absorción y emisión de energía radiante. A la radiación electromagnética se le atribuye el cambio de energía en las transiciones de los electrones de unos niveles atómicos a otros. La espectroscopia estudia en que frecuencia o longitud de onda una sustancia puede absorber o emitir energía en forma de cuanto de luz. El efecto se debe a la incidencia de un fotón iluminado con un rayo láser cuando incide sobre una molécula y la consecuente interacción con la nube de electrones debido a los cambios en la polarización de los enlaces de esta, excitando la molécula a un estado virtual. El patrón de frecuencias de desplazamiento está determinado por estados vibracionales y rotacionales típicos de la muestra bajo estudio [18].

Esta técnica proporciona una baja intensidad de las señales, de modo que la espectroscopía Raman mejorada (SERS) es una alternativa.

#### 3.2.1. Espectroscopía de Raman Mejorada (SERS)

Recientemente se ha demostrado que la dispersión Raman mejorada en la superficie (SERS) es una técnica prometedora para caracterizar la composición química de la matriz de la biopelícula[12]. Puede proporcionar información de huellas dactilares sobre moléculas, bacterias y biopelículas sin necesidad de ninguna tinción. La fuente electromagnética normalmente mejora cuando se proporciona nanopartículas de plata u oro (Ag o Au NPs) debido a mejoras electromagnéticas (a través de la resonancia de plasmón de la superficie) como mejoras químicas (a través de la transferencia de carga al contacto de una molécula con la nanopartícula). Como resultado, la sensibilidad en SERS aumenta significativamente y se reduce el límite de detección[9].

SERS se empleó como una nueva y no invasiva técnica para estudiar el desarrollo de biopelículas a partir de la adhesión bacteriana inicial [11].

### 3.3. Comparación espectroscopía del infrarrojo / espectroscopía de Raman.

La espectroscopia Raman es una técnica de espectroscópica molecular que usa la interacción de la luz con la materia para obtener información sobre la composición o las características de un material, como ocurre en la espectroscopía del infrarrojo [19].

La información proporcionada por la espectroscopia Raman es el resultado de un proceso de dispersión de la luz, mientras que la espectroscopia IR se basa en la absorción de la luz. La espectroscopia Raman proporciona información sobre las vibraciones intramoleculares e intermoleculares y puede proporcionar una comprensión adicional sobre una reacción.

Tanto la espectroscopia de infrarrojo como Raman proporcionan un espectro característico de las vibraciones específicas de una molécula la conocida “huella molecular” y son valiosas para identificar una sustancia. Sin embargo, la espectroscopia Raman puede proporcionar información adicional sobre los modos de frecuencia más baja [19].

Además, moléculas apolares no absorben en el infrarrojo o si son poco polares dan lugar a absorciones muy débiles. Mientras que, en Raman, ocurre lo contrario. De esta forma, ambas técnicas se complementan y pueden llegar a ser muy útiles a la hora de identificar cualquier tipo de estructura.

### 3.4. Técnica ICP-OES

El plasma de acoplamiento inductivo (ICP) es una fuente de ionización que junto a un espectrofotómetro de emisión óptico (OES) constituye el equipo de ICP-OES. Esta técnica consiste en la introducción continua de la muestra líquida utilizando un sistema de nebulización que produce un aerosol que es transportado por una corriente de argón a la antorcha del plasma acoplado inductivamente por radio frecuencia. En el plasma, debido a las altas temperaturas generadas, los elementos son atomizados e ionizados lo que da

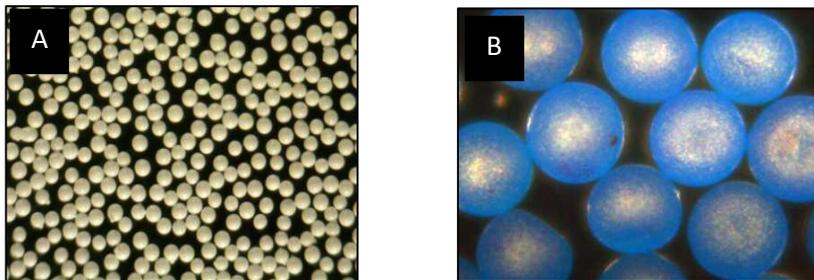
lugar a espectros de emisión atómicos de líneas características. Los espectros son dispersados por la red de difracción y el detector sensible a la luz se encarga de medir las intensidades de las líneas. La información es procesada por el sistema informático[20].

#### 4. PARTE EXPERIEMENTAL.

En esta parte, se describirá de forma detallada el procedimiento experimental llevado a cabo para el objetivo propuesto.

##### 4.1. Microplásticos analizados

Para este estudio, han sido utilizados dos tipos de microplásticos de la casa comercial Cospheric como se muestran en la figura 4.



**Figura 4.** Microesferas de polietileno A) blancas (densidad de 1.35 g/cc y un tamaño de 250-300  $\mu\text{m}$ ) B) azules (densidad de 1.08 g/cc y un tamaño de 212-250  $\mu\text{m}$ )

[https://www.cospheric.com/WPMS\\_opaque\\_white\\_polymer\\_spheres.htm](https://www.cospheric.com/WPMS_opaque_white_polymer_spheres.htm) / [https://www.cospheric.com/BLPMS\\_polymer\\_blue\\_spheres\\_density1075.htm](https://www.cospheric.com/BLPMS_polymer_blue_spheres_density1075.htm)

Las microesferas están formadas por más de un 70% masa/masa de polietileno (PE) y menos del 30% masa/masa de aditivos. En el caso de las microesferas blancas contienen óxido de titanio ( $\text{TiO}_2$ ) y son extremadamente opacas [21] mientras que en el caso de las microesferas azules, contienen el aditivo que le proporciona ese color.

Las propiedades de las partículas como la rugosidad, la carga de la superficie, el área de la superficie, la densidad, etc. De los microplásticos, son importantes de determinar para conocer su capacidad de adsorber metales y/o actuar como

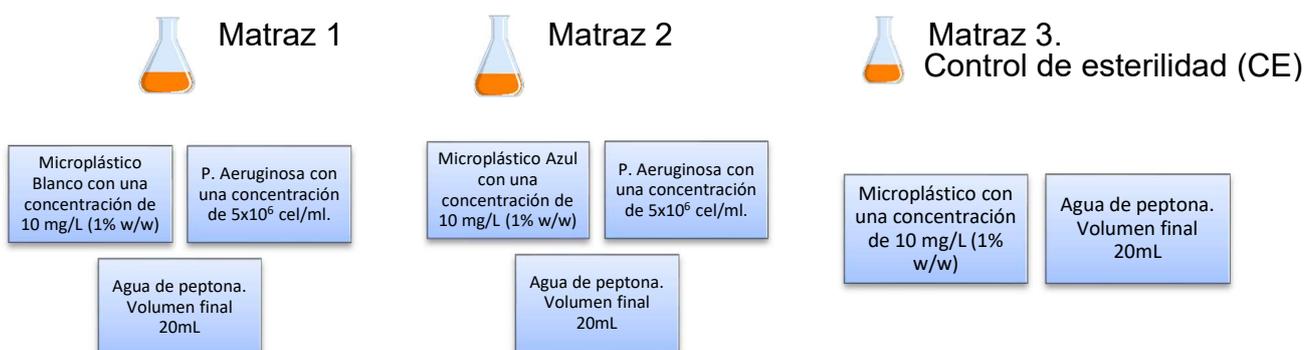
sustratos de microorganismos. Desde una perspectiva material, todos estos parámetros son generalmente relevantes para el proceso de fijación[6].

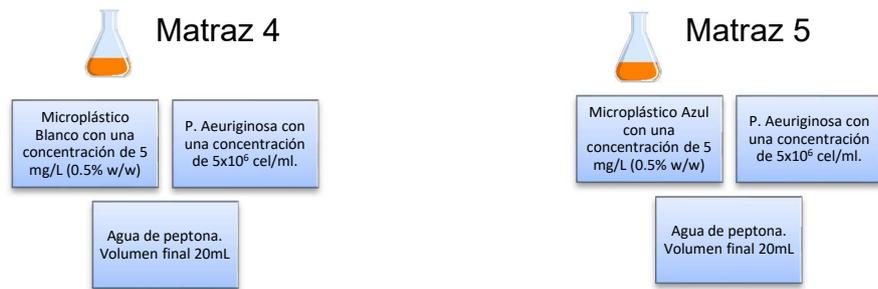
Ambos microplásticos son hidrófobos, numerosos estudios han demostrado que los microorganismos se adhieren más rápidamente a este tipo de superficies que a las hidrófilas[6]. También han evidenciado que el tipo de microplástico y la densidad del material pueden influir en la absorción de diferentes sustancias químicas en su superficie [4]. Por otro lado, el tamaño de los microplásticos importa, ya que determinará el área de superficie para la absorción de sustancias químicas. Estos dos microplásticos tienen pequeño tamaño, esto conlleva a que tengan grandes áreas de superficie para la adsorción[4]. Por último como ambos contienen aditivos estos alteran las propiedades de los microplásticos, lo que hacen que estén más predispuestos a adherirse a diferentes sustancias[4].

Cabe destacar que no solo las propiedades de los microplásticos son importantes para conocer la capacidad que tienen de adsorber metales o microorganismos, sino que también dependen los factores ambientales, como la temperatura, la fuerza iónica o el pH [6].

#### 4.2. Formación de biopelículas

Es necesario estudiar la naturaleza de las transformaciones de los microplásticos para comprender los riesgos ambientales que plantean estos contaminantes. Para ello el procedimiento seguido para la formación de biopelículas con cada uno de los plásticos se describe a continuación[13]:





100 rpm, 28 °C , 4 días

- CE



Eliminar el medio. Añadir 3 mL de Cloruro de sodio (NaCl) y transferirlo a eppendorf. Centrifugar a 1000 rpm durante 5 minutos. Eliminar el sobrenadante y congelar.

- Matraz 1 y 2 (procedimiento → Creación biopelícula)



Eliminar el sobrenadante y transferirlos a tubos eppendorf. Añadir 1 mL de Cloruro de sodio (NaCl) a los tubos para eliminar las células del medio.

- Matraz 1, 2, 4 y 5 (procedimiento → Eliminación de células adsorbidas Recuperación del microplástico)



Eliminar el sobrenadante y transferirlos a tubos eppendorf. Añadir 1 mL de Cloruro de sodio (NaCl) a los tubos.

Los eppendorf se colocarán en el vortex durante 10 minutos para desprender las células adheridas.

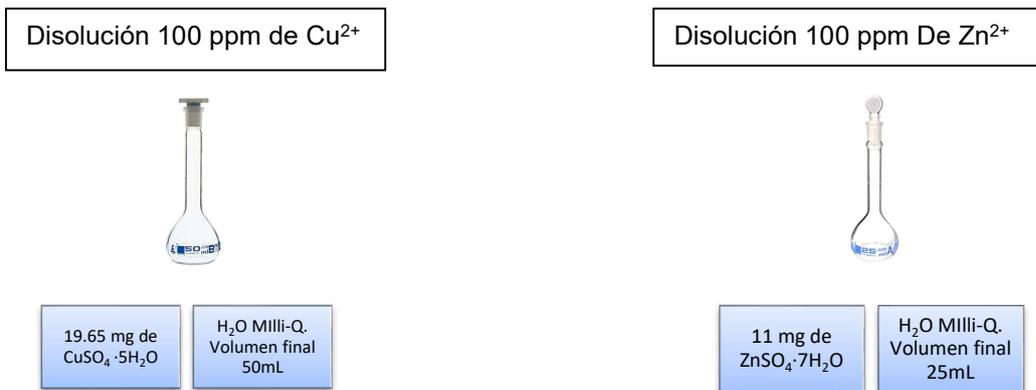
Con este procedimiento, se quiere estudiar si los microplásticos se ven afectados tras el proceso de eliminación de las células adsorbidas.

Se utilizaron estas dos concentraciones (1% y 0,5% w/w) de los microplásticos debido a que son concentraciones a las que se ha descrito que pueden encontrarse los MPs en ambientes naturales[13],[22].

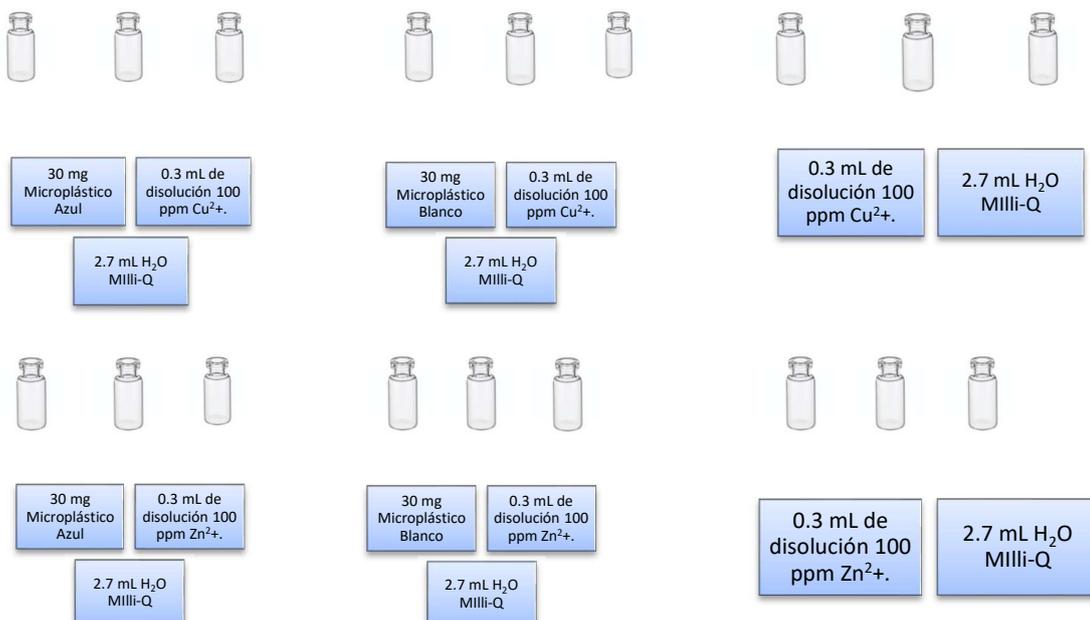
### 4.3. Adsorción de los metales Cu (II) y Zn (II) en los microplásticos en estudio.

Dos metales divalentes, el Cu (II) y Zn (II) fueron seleccionados para el estudio de la adsorción en los microplásticos considerados. Estos metales fueron seleccionados porque son los que se encuentran habitualmente en mayor concentración en lodos de depuradora donde pueden entrar en contacto con los Microplásticos también presentes.

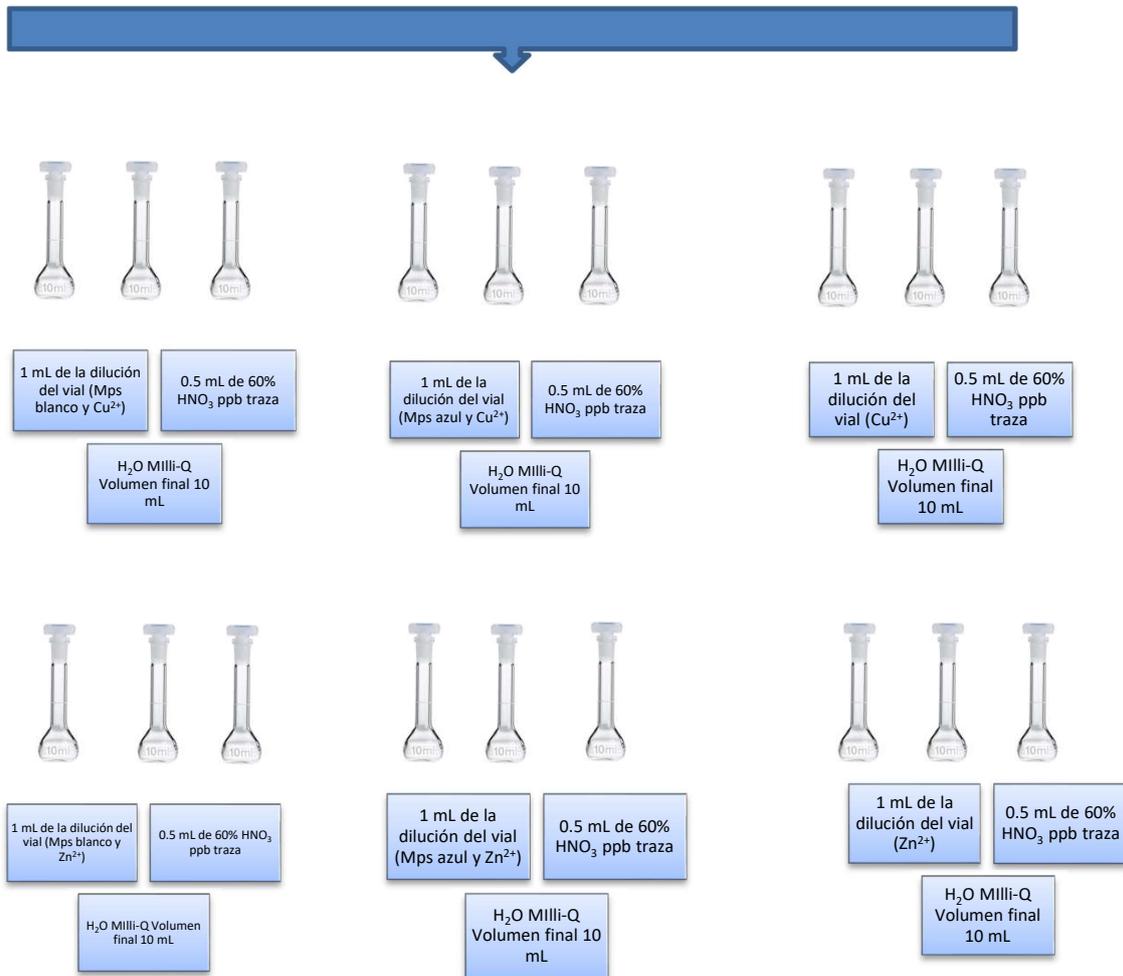
El procedimiento que se llevó a cabo fue el siguiente [23],[24],[25]:



Una vez preparadas las diluciones:



150 rpm /24h



Se repitió el mismo procedimiento, dejando los viales a 150 rpm durante 96 h.

#### 4.4. Muestras obtenidas.

A continuación, en las Tablas 2-3 se podrán observar las muestras preparadas.

Tabla 2. Muestras sólidas para determinar la adsorción de microorganismos

Muestra	Nomenclatura
Microplástico Blanco inicial	MPs-White
Microplástico Blanco incubado con agua de peptona – Control de esterilidad	MPs-W-CE
Microplástico Blanco 1% - Formación de la biopelícula	MPs-W-Biofilm
Microplástico Blanco 0,5% tras eliminar las células adsorbidas (Recuperación el MPs)	MPs-W-0,5%

<b>Microplástico Blanco 1% tras eliminar las células adsorbidas (Recuperación el MPs)</b>	MPs- W-1%
<b>Microplástico Azul inicial</b>	MPs-Blue
<b>Microplástico Azul incubado con agua de peptona – Control de esterilidad</b>	MPs-B-CE
<b>Microplástico Azul 1% - Formación de la biopelícula</b>	MPs-B-Biofilm
<b>Microplástico Azul 0,5% tras eliminar las células adsorbidas (Recuperación el MPs)</b>	MPs-B-0,5%
<b>Microplástico Azul 1% tras eliminar las células adsorbidas (Recuperación el MPs)</b>	MPs-B-1%

**Tabla 3.** Muestras líquidas para determinar la adsorción de metales

<b>Muestra</b>	<b>Nomenclatura</b>
<b>Microplástico Blanco con Cu<sup>2+</sup> (tres réplicas)</b>	W- Cu
<b>Microplástico Blanco con Zn<sup>2+</sup> (tres réplicas)</b>	W- Zn
<b>Microplástico Azul con Cu<sup>2+</sup> (tres réplicas)</b>	B-Cu
<b>Microplástico Azul con Zn<sup>2+</sup> (tres réplicas)</b>	W-Zn
<b>Disolución de Cu<sup>2+</sup> (Blanco) (tres réplicas)</b>	Cu
<b>Disolución de Zn<sup>2+</sup> (Blanco) (tres réplicas)</b>	Zn

#### 4.5. Condiciones de las medidas espectrales.

Para llevar a cabo el estudio de todas las muestras obtenidas, se tomaron los diferentes espectros mediante técnicas de espectroscopía.

##### 4.5.1. Espectroscopía de infrarrojos.

Para realizar las mediciones se utilizaron las siguientes condiciones[2]:

- ✓ Las muestras se secaron durante 24 h antes de su análisis
- ✓ Se utilizó una resolución de 4 cm<sup>-1</sup>
- ✓ Número de Scans: 64
- ✓ Rango: 600-4000 cm<sup>-1</sup>

- ✓ Software: OMNIC™
- ✓ Se realizaron 10 espectros de cada muestra y finalmente se hizo la media para cada muestra.

#### 4.5.2. Espectroscopía Raman.

Las diferentes medidas se llevaron a cabo con las siguientes condiciones[26]:

- ✓ Cada muestra se colocó en un portaobjetos.
- ✓ Láser de 532 nm con una potencia de 8 mW.
- ✓ Objetivo de 50x
- ✓ Una apertura de 50µm slit
- ✓ Un tiempo total para cada espectro de 1 minuto (3 exposiciones por segundo x 20 exposiciones)
- ✓ Rango: 50-3200 cm<sup>-1</sup>
- ✓ Software: OMNIC™
- ✓ Se realizaron 10 espectros de cada muestra en diferentes partes y finalmente se hizo la media de cada muestra.

#### 4.5.3. Espectroscopía Raman Mejorada.

En este caso se utilizaron las mismas condiciones, salvo una diferencia. Las muestras no se colocaron directamente en un portaobjetos, si no que antes se les añadió la disolución de nanopartículas de plata.

El procedimiento que se llevó a cabo fue el siguiente:

Las partículas de AgNPs preparadas en laboratorio según bibliografía[12], se lavaron con H<sub>2</sub>O Mili Q, para ello se centrifugaron a 8000 rpm durante 15 minutos, se retiró el sobrenadante y se le lavó. Este lavado se hizo 3 veces.

Una vez este proceso se añadieron 10 µL de AgNPs a la muestra que contenía el microplástico con el biofilm y se dejó evaporar durante 1-2h en un portaobjetos. Transcurrido este tiempo se analizó Raman.

#### 4.6. Condiciones técnicas ICP-OES

Estas mediciones se realizaron en el centro de apoyo de la Universidad de Alcalá.

A partir de una disolución “madre” de cobre y de zinc se prepararon el resto de las disoluciones patrón que se utilizaron para la obtención de las rectas de calibrado. También se utilizó un patrón interno.

Posteriormente, el blanco, los patrones y las muestras se pasaron por los tubos Falcon de 50 ml y se introdujeron en el inyector automático.

Las mediciones se llevaron a cabo con dos longitudes de onda por metal para descartar posibles interferencias.

Cu: 324,7554 nm/ 327,3958 nm

Zn: 202,548 nm/213,857 nm

Y: patrón interno 371,029

## 5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En esta parte, se describirá de forma detallada los resultados obtenidos, tras analizar todas las muestras de los microplásticos en FTIR y Raman, y después los resultados de la adsorción con metales.

### 5.1. Espectro IR de los microplásticos iniciales

El espectro representativo en infrarrojo del Microplástico blanco, se puede observar en la figura 5 a y el del microplástico azul en la figura 5 b. Se pueden ver las bandas características del polietileno[10]. En torno a los 2800-2900  $\text{cm}^{-1}$  se encuentran las bandas simétricas y asimétricas de los enlaces C-H (estiramiento simétrico y asimétrico del  $\text{CH}_2$ ), y en torno al número de onda 1420-1450  $\text{cm}^{-1}$  las bandas de las regiones de flexión del  $\text{CH}_2$  tal y como se indicó en la tabla 1.

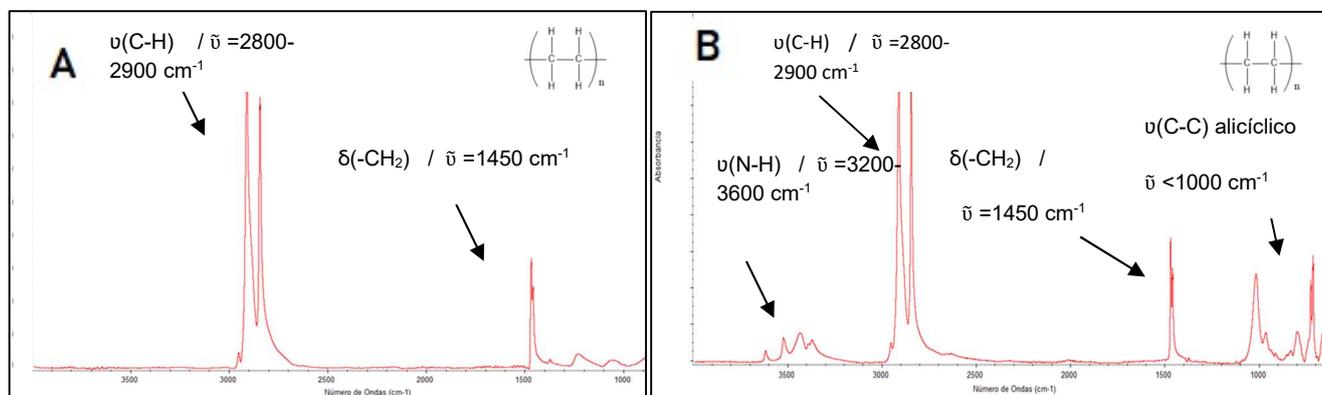
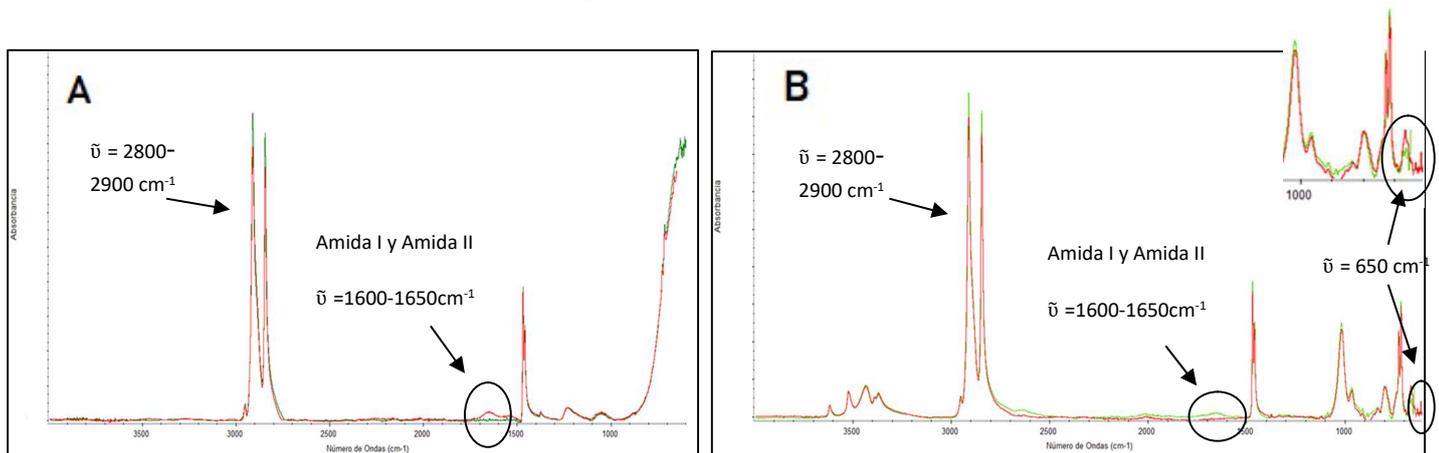


Figura 5.A) Representación del espectro del MPs-White en infrarrojo. B) Representación del espectro del MPs-Blue en infrarrojo. Con las condiciones descritas en el apartado experimental

En el caso del microplástico azul se identificó mediante la bibliografía un tinte: PB15 (tinte azul)[5]. Como se observa este se superpone completamente a la matriz del polímero y por lo tanto se pueden encontrar las bandas de los anillos alicíclicos por debajo de 1000  $\text{cm}^{-1}$  y las bandas de las aminas (N-H) en torno a los 3500  $\text{cm}^{-1}$  características de este tipo de tinte.

## 5.2. Espectro IR del Microplástico blanco y azul modificado después de la formación de la biopelícula

Después del proceso experimental de la formación de la biopelícula sobre los microplásticos se analizan las muestras correspondientes al microplástico blanco como se observa en la figura 6 A y al microplástico azul en la figura 6 B.



**Figura 6. A)** Representación del microplástico blanco inicial (verde) y del microplástico blanco con la biopelícula formada (rojo) en Infrarrojo.

**B)** Representación del microplástico azul inicial (rojo) y del microplástico azul con la biopelícula formada (verde) en infrarrojo.

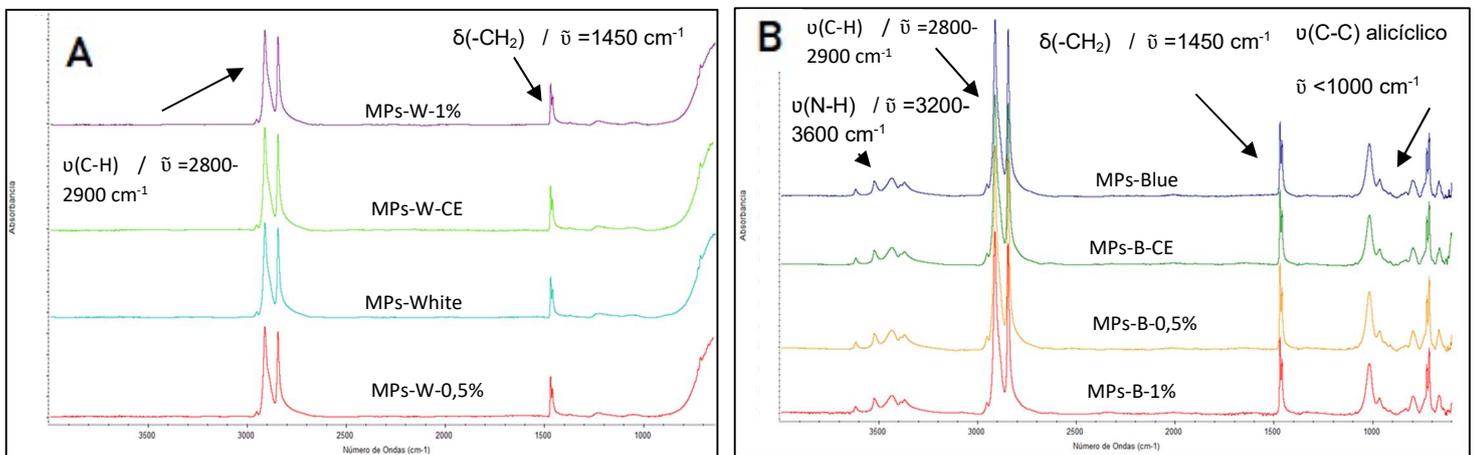
El cambio en los espectros es como resultado de la actividad metabólica de la *Pseudomona aeruginosa* durante la formación del biofilm.

La banda en torno a 1600-1650  $\text{cm}^{-1}$  se atribuye a la amida II (enlace N-H) y amida I (enlace C=O) y aparece tras las 96 h de incubación. Las bandas a 1150- 1380 y 1489  $\text{cm}^{-1}$  se pueden atribuir por revisión bibliográfica a la Piocianina (es un alcaloide que constituye una de las muchas toxinas producidas y secretadas por la bacteria), y a la adenina, además estas bandas aparecen solapadas con el polietileno [7].

La intensidad de las bandas alrededor de 2900  $\text{cm}^{-1}$  (C-H) aumentan por la presencia de la bacteria y su constitución, ya que están formadas por proteínas. Por último, hay que destacar que en torno a los 650  $\text{cm}^{-1}$  la intensidad de la banda varía, esto es característico de las bases de DNA [7].

### 5.3. Espectro IR del microplástico blanco y azul tras la recuperación.

El correspondiente espectro del microplástico blanco de este proceso, se encuentran en la figura 7 A y el del microplástico azul en la 7 B. En este caso en ambos se pueden ver como anteriormente, las bandas características del polietileno en torno a  $2800-2900\text{ cm}^{-1}$  y  $1420-1450\text{ cm}^{-1}$ . En el caso del Microplástico azul también se siguen observando las bandas correspondientes al aditivo.



**Figura 7. A)** Representación del Espectro del Microplástico blanco inicial (azul), del microplástico blanco con agua de peptona, control de esterilidad (verde), del microplástico blanco al 1% tras la eliminación de las células (violeta) y del microplástico blanco al 0,5 % tras la eliminación de las células (rojo) en infrarrojo.

**B)** Representación del Espectro del Microplástico azul inicial (azul), del microplástico azul con agua de peptona, control de esterilidad (verde), del microplástico azul al 1% tras la eliminación de las células (rojo) y del microplástico azul al 0,5 % tras la eliminación de las células (amarillo) en Infrarrojo.

El objetivo principal de realizar este proceso era ver si después de la formación de la biopelícula y los consiguientes lavados, se podría recuperar el microplástico inicial indicando a sí una leve interacción entre la bacteria y los microplásticos.

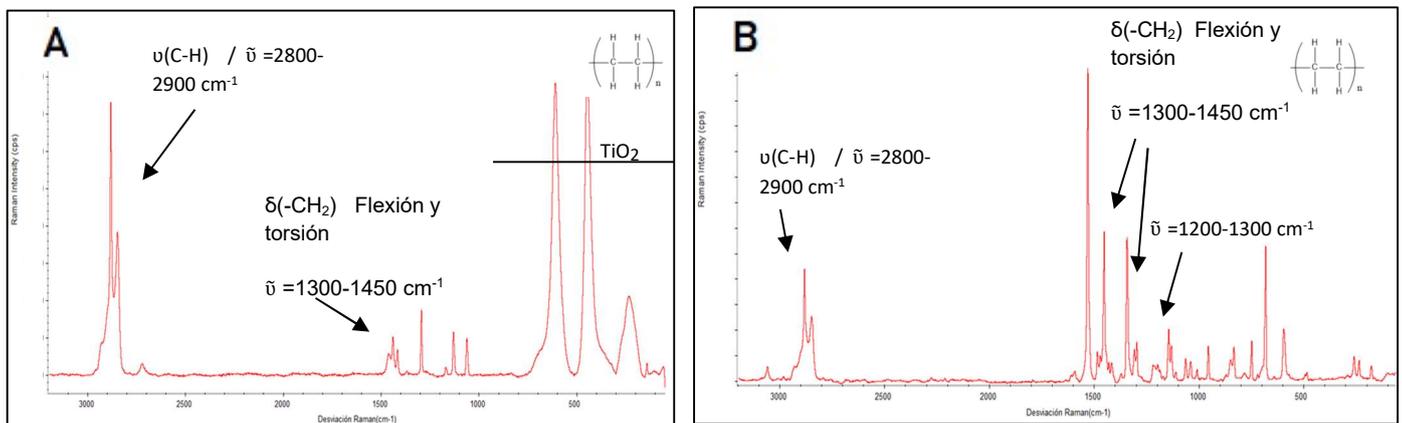
Como se puede observar, no se observan diferencias entre el microplástico inicial y los recuperados, no existen desplazamiento ni aparición de nuevas bandas, esto puede significar que las células tienen la capacidad de eliminarse y por lo tanto los enlaces entre MPs-biofilm son débiles.

#### 5.4. Espectro Raman de los Microplásticos iniciales.

El espectro representativo en Raman del Microplástico blanco, se puede observar en la figura 8 A y el del Microplástico azul en la figura 8 B. En ambos se observan igualmente las bandas características del polietileno en torno a  $2800\text{-}2900\text{ cm}^{-1}$  y  $1420\text{-}1450\text{ cm}^{-1}$  marcadas en los espectros.

El rango en Raman es superior que en IR, y se pueden observar bandas por debajo de los  $650\text{ cm}^{-1}$  en este caso corresponden a la región representativa del aditivo que contiene este microplástico blanco, el  $\text{TiO}_2$ [5][10].

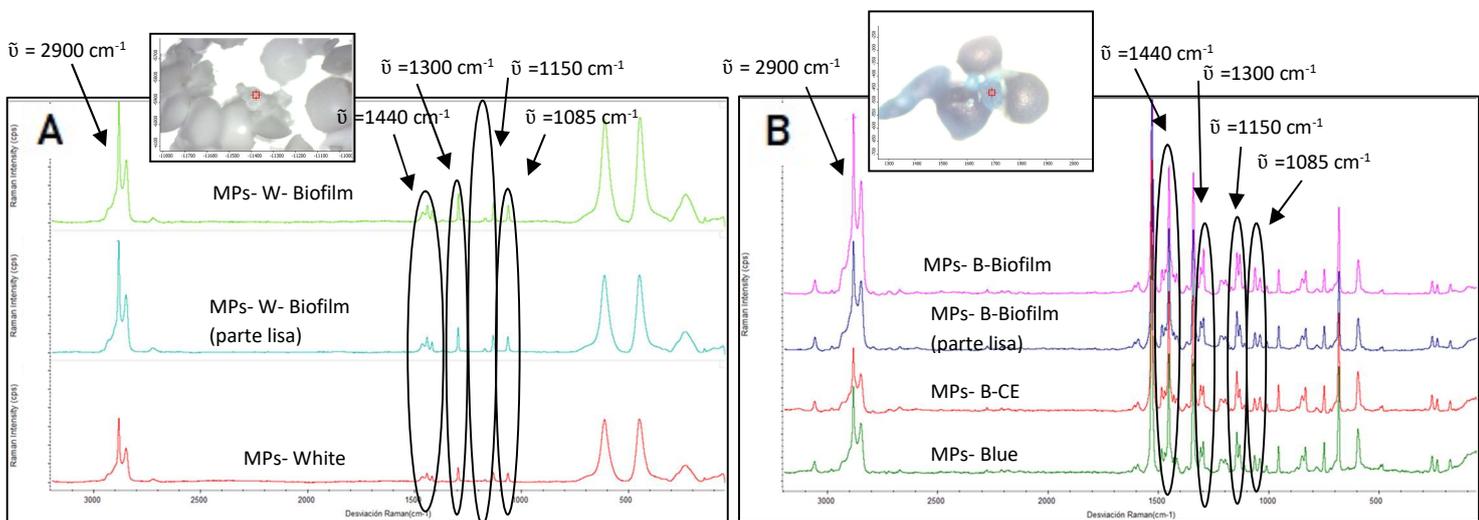
El en caso del microplástico azul, se observa el aditivo que enmascara totalmente al espectro. Este aditivo contiene ciclos aromáticos, se pueden observar en la región de  $1500\text{-}1600\text{ cm}^{-1}$  y por debajo de  $1000\text{ cm}^{-1}$ , y grupo amina (C-N) en torno a  $1200\text{-}1300\text{ cm}^{-1}$ .



**Figura 8.** A) Representación del espectro del MPs-White en Raman. B) Representación del espectro del MPs-Blue en Raman. Con las condiciones descritas en el apartado experimental

### 5.5. Espectro Raman del Microplástico blanco y azul modificado después de la formación de la biopelícula

Tras la formación de biofilm, se obtuvo el espectro mostrado en la figura 9 A para el microplástico blanco y 9 B para el microplástico azul. Hay que destacar que, al observar por el microscopio, se veía una parte que corresponde a los microplásticos iniciales (bolas lisas) y otra parte que se encuentra en la superficie que es la biopelícula formada.



**Figura 9** Representación del Espectro del Microplástico blanco inicial (rojo), del microplástico blanco con la biopelícula formada enfocada en la parte lisa (azul) y del microplástico blanco enfocando a la biopelícula formada (verde) en Raman.

**B)** Representación del Espectro del Microplástico azul inicial (verde), del control de esterilidad (rojo) del microplástico azul con la biopelícula formada enfocada en la parte lisa (azul) y del microplástico azul enfocando a la biopelícula formada (rosa) en Raman

El cambio en los espectros es como resultado de la actividad metabólica de la *Pseudomonas aeruginosa* durante la formación del biofilm. Además, por todas las interacciones entre la proteína y el microplástico hace que las bandas aumenten de intensidad.

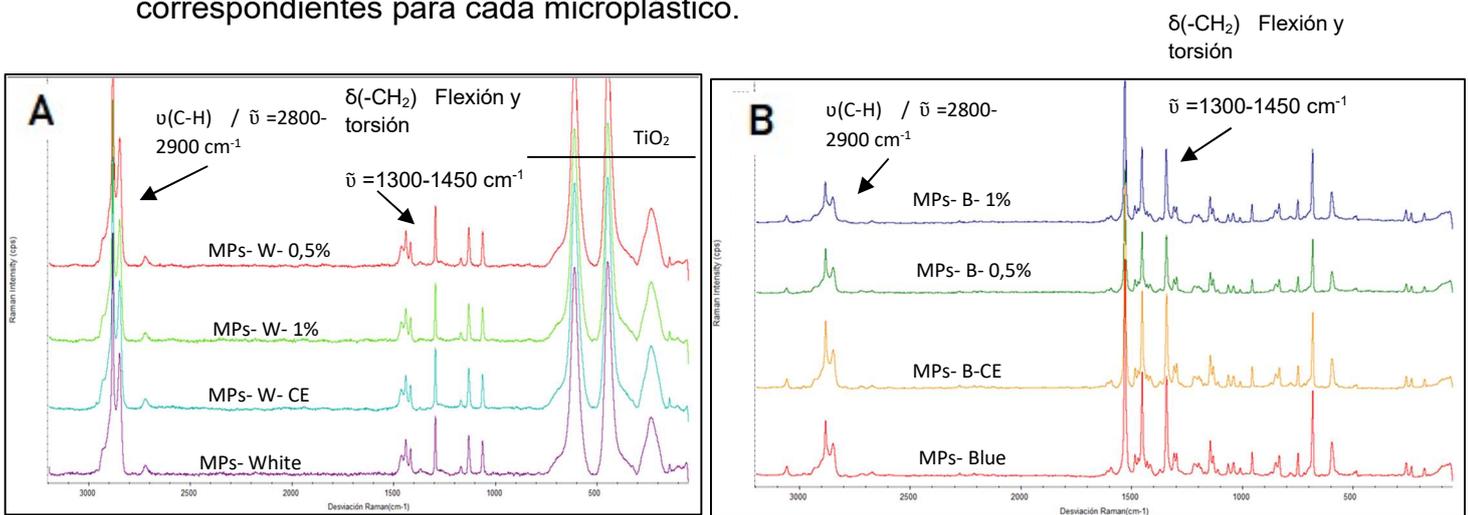
La intensidad de los picos alrededor de  $2900\text{ cm}^{-1}$  (C-H) han aumentado debido a la interacción de la bacteria con el microplástico, ya que esta contiene proteínas [27].

Aparece un nuevo pico más intenso sobre 1085 y 1150  $\text{cm}^{-1}$  (rodeado en el espectro), el cual puede pertenecer a la Piocianina (es un alcaloide que constituye una de las muchas toxinas producidas y secretadas por la bacteria)[7]. En torno a 1300  $\text{cm}^{-1}$  la intensidad de la banda aumenta, este pico es característico de las bases de DNA[7],[9].

Las bandas entre 1440 y 1445  $\text{cm}^{-1}$  se utilizan para investigar cambios en el contenido de lípidos en el biofilm y se encontró que las bacterias gram-negativas como la *Pseudomona aeruginosa* proporcionan una gran cantidad de lípidos durante la maduración, como se puede observar la banda aumenta[9],[12].

### 5.6. Espectro Raman del microplástico blanco y azul tras la recuperación.

El correspondiente espectro de este proceso, se encuentran en la figura 10 A para el microplástico blanco y en la figura 10 B para el microplástico azul. En este caso se pueden ver como anteriormente, las bandas características del polietileno en torno a 2800-2900  $\text{cm}^{-1}$  y 1300-1450  $\text{cm}^{-1}$  y también los aditivos correspondientes para cada microplástico.



**Figura 10 A)** Representación del Espectro del Microplástico blanco inicial (violeta), del microplástico blanco con agua de peptona, control de esterilidad (azul), del microplástico blanco al 1% tras la eliminación de las células (verde) y del microplástico blanco al 0.5 % tras la eliminación de las células (rojo) en Raman.

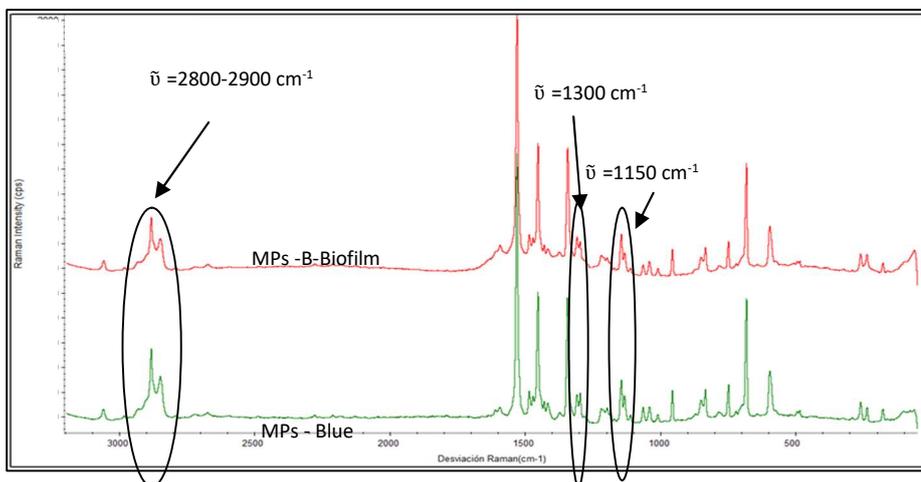
**B)** Representación del Espectro del Microplástico azul inicial (verde), del microplástico azul con agua de peptona, control de esterilidad (amarillo), del microplástico azul al 1% tras la eliminación de las células (azul) y del microplástico azul al 0.5 % tras la eliminación de las células (verde) en Raman.

Como se ha comentado anteriormente el principal objetivo era ver si después de la formación de la biopelícula y la eliminación de las células, se podría recuperar el microplástico inicial y de esta forma indicar que las interacciones son muy débiles.

Como se observa, no hay diferencias entre el microplástico inicial y los recuperados tras diferentes lavados, no existen desplazamiento ni nuevas bandas características de esta unión (como la formación de amidas), esto puede significar que las células tienen la capacidad de eliminarse y por lo tanto sus interacciones no son tan fuertes.

### 5.7. Espectro Raman del Microplástico azul modificado después de la formación de la biopelícula (SERS).

Después del proceso de formación de la biopelícula, para aumentar la sensibilidad de la técnica, se utilizaron las nanopartículas de plata, tal y como se ha comentado en la parte experimental. Solo se hizo para el microplástico azul. Tras este proceso se obtuvo el espectro mostrado en la figura 11.



**Figura 11.** Representación del Espectro del Microplástico azul inicial (verde), y del microplástico azul enfocando a la biopelícula formada (roja) en Raman SERS.

Como se muestra en el espectro, en torno a  $2800-2900\text{ cm}^{-1}$  la relación de intensidades ha variado, eso es debido a la interacción de la bacteria con el microplástico, ya que esta contiene largas cadenas de proteínas [7].

En torno 1085 y 1150  $\text{cm}^{-1}$  (rodeado en el espectro), también aparece un cambio en las intensidades, estas bandas corresponden a la Pilocianina (es un alcaloide que constituye una de las muchas toxinas producidas y secretadas por la bacteria)[7][11][12]. Realmente no se observan tantos cambios como se esperaban, se debería de hacer una deposición más larga de las nanopartículas y solo se pudo hacer una.

### 5.8. Capacidad de adsorción de los metales a los microplásticos.

En esta parte, se estudia la capacidad de adsorción de metales pesados a los microplásticos. Tras el proceso descrito en el apartado 4.3, todos los matraces fueron analizados con la técnica de ICP-OES. En la tabla 4 se observan los  $\mu\text{g}$  de  $\text{Cu}^{2+}$  y  $\text{Zn}^{2+}$  por gramo de microplástico adsorbido y en la figura 12 se representa en forma gráfica.

Tabla 4. Adsorción de los microplásticos en  $\mu\text{g Cu}^{2+}/\text{g MP}$ s y  $\mu\text{g Zn}^{2+}/\text{g MP}$ s a las 24 h y 96 h

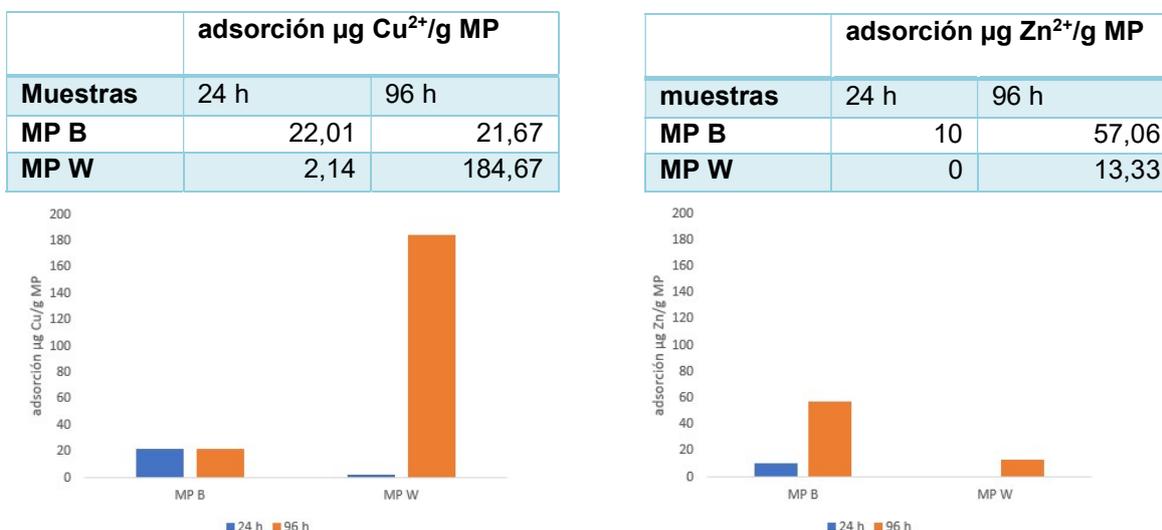


Figura 12. Representación gráfica de las adsorciones de los microplásticos en  $\mu\text{g Cu}^{2+}/\text{g MP}$ s y  $\mu\text{g Zn}^{2+}/\text{g MP}$ s a las 24 h y 96 h

Como se puede observar la cinética cambia, el microplástico azul en contacto con el  $\text{Cu(II)}$  rápidamente consigue el equilibrio, mientras que en los otros casos no se podría determinar si a las 96 h se alcanza. También hay que observar que el microplástico blanco tiene la capacidad de adsorber más cantidad de  $\text{Cu(II)}$  que de  $\text{Zn(II)}$  [23][24][25] y el microplástico azul lo contrario.

## 6. CONCLUSIONES

En el laboratorio químico, las pruebas realizadas pueden responder de manera confiable a las preguntas planteadas por la policía criminal. Por lo tanto, debe existir un método de análisis validado que brinde una garantía de los resultados.

El principal objetivo de este estudio era determinar la capacidad de adsorción de diferentes microorganismos y metales pesados en los microplásticos poniendo en evidencia que las técnicas que se llevan a cabo sirven para determinar la emergente contaminación en un caso forense.

Durante un periodo de 4 días de incubación con la bacteria *Pseudomona Aeruginosa*, los microplásticos experimentaron cambios fisicoquímicos. El cambio más destacable fue:

- ✓ Aparición de una nueva banda (amidas).

Por lo que estos microplásticos tienen capacidad de adsorber este tipo de bacterias, pero las interacciones entre ambos son débiles ya que después de los lavados desaparece esa unión. Además, tanto infrarrojo como Raman son unas técnicas potenciales para la identificación rápida de los microorganismos que forman una biopelícula, son técnicas complementarias y no destructibles ya que no destruyen la muestra. Por lo tanto, la simplicidad, la velocidad y la capacidad de recuperación de la muestra, son una ventaja real en el entorno forense.

En cuanto a la capacidad de adsorción de los metales, en general la de  $\text{Cu}^{2+}$  fue mayor que la de  $\text{Zn}^{2+}$  aunque en cada tipo de microplástico se comporta de diferente manera. En el caso del microplástico blanco se adsorbió más cantidad de  $\text{Cu}^{2+}$  y en el microplástico azul, más cantidad de  $\text{Zn}^{2+}$ . Se podría concluir que los microplásticos pueden adsorber cantidades de metales pesados aunque son porcentajes muy bajos y por debajo de la cantidad máxima permitida[28].

## 7. BIBLIOGRAFÍA

- [1] C. Gwinnett, E. Harrison, A. Osborne, A. Pivato, and G. Varghese, “Sampling microplastics for environmental forensic applications,” *Detritus*, vol. 14, pp. I–III, 2021, doi: 10.31025/2611-4135/2021.14080.
- [2] J. Yu *et al.*, “Characterization of microplastics in environment by thermal gravimetric analysis coupled with Fourier transform infrared spectroscopy,” *Mar. Pollut. Bull.*, vol. 145, no. May, pp. 153–160, 2019, doi: 10.1016/j.marpolbul.2019.05.037.
- [3] L. C. Woodall, C. Gwinnett, M. Packer, R. C. Thompson, L. F. Robinson, and G. L. J. Paterson, “Using a forensic science approach to minimize environmental contamination and to identify microfibrils in marine sediments,” *Mar. Pollut. Bull.*, vol. 95, no. 1, pp. 40–46, 2015, doi: 10.1016/j.marpolbul.2015.04.044.
- [4] F. K. Mammo *et al.*, “Microplastics in the environment: Interactions with microbes and chemical contaminants,” *Sci. Total Environ.*, vol. 743, p. 140518, 2020, doi: 10.1016/j.scitotenv.2020.140518.
- [5] L. Frère *et al.*, “A semi-automated Raman micro-spectroscopy method for morphological and chemical characterizations of microplastic litter,” *Mar. Pollut. Bull.*, vol. 113, no. 1–2, pp. 461–468, 2016, doi: 10.1016/j.marpolbul.2016.10.051.
- [6] C. D. Rummel, A. Jahnke, E. Gorokhova, D. Kühnel, and M. Schmitt-Jansen, “Impacts of biofilm formation on the fate and potential effects of microplastic in the aquatic environment,” *Environ. Sci. Technol. Lett.*, vol. 4, no. 7, pp. 258–267, 2017, doi: 10.1021/acs.estlett.7b00164.
- [7] S. Keleştemur, Z. Çobandede, and M. Çulha, “Biofilm formation of clinically important microorganisms on 2D and 3D poly (methyl methacrylate) substrates: A surface-enhanced Raman scattering study,” *Colloids Surfaces B Biointerfaces*, vol. 188, no. December 2019, 2020, doi: 10.1016/j.colsurfb.2019.110765.

- [8] K. Y. R. Gutierrez Taipe, “Influencia de factores ambientales de crecimiento microbiano en la degradación de polietileno de baja densidad por la bacteria *Pseudomonas aeruginosa* en Huancayo,” *Univ. Cont.*, p. 165, 2018, [Online]. Available: <https://repositorio.continental.edu.pe/handle/20.500.12394/4507>.
- [9] S. Keleştemur, E. Avci, and M. Çulha, “Raman and surface-enhanced Raman scattering for biofilm characterization,” *Chemosensors*, vol. 6, no. 1, 2018, doi: 10.3390/chemosensors6010005.
- [10] M. Rocchia, I. Ruff, and A. Vianello, “Microplastic identification and characterization by Raman imaging spectroscopy,” *ThermoScientific*, pp. 1–5, 2017, [Online]. Available: [https://assets.thermofisher.com/TFS-Assets/MSD/Reference-Materials/WP52981-microplastic-identification-characterization-raman-imaging-spectroscopy.pdf?icid=MSD\\_SPEC\\_MOL\\_SP\\_HDI\\_IDEnvirMicroplastics-food-beverage\\_6782\\_0618](https://assets.thermofisher.com/TFS-Assets/MSD/Reference-Materials/WP52981-microplastic-identification-characterization-raman-imaging-spectroscopy.pdf?icid=MSD_SPEC_MOL_SP_HDI_IDEnvirMicroplastics-food-beverage_6782_0618).
- [11] P. Chen, L. Cui, and K. Zhang, “Surface-enhanced Raman spectroscopy monitoring the development of dual-species biofouling on membrane surfaces,” *J. Memb. Sci.*, vol. 473, pp. 36–44, 2015, doi: 10.1016/j.memsci.2014.09.007.
- [12] Y. Chao and T. Zhang, “Surface-enhanced Raman scattering (SERS) revealing chemical variation during biofilm formation: From initial attachment to mature biofilm,” *Anal. Bioanal. Chem.*, vol. 404, no. 5, pp. 1465–1475, 2012, doi: 10.1007/s00216-012-6225-y.
- [13] M. Gong, G. Yang, L. Zhuang, and E. Y. Zeng, “Microbial biofilm formation and community structure on low-density polyethylene microparticles in lake water microcosms,” *Environ. Pollut.*, vol. 252, pp. 94–102, 2019, doi: 10.1016/j.envpol.2019.05.090.
- [14] A. S. Anal, T. Basadas, E. N. Espectroscopia, and L. A. I. Petroqu, “Metodologías analíticas basadas en espectroscopia de infrarrojo y calibración multivariante. aplicación a la industria petroquímica,” 2002.

- [15] L. Vasquez Moreno, "Tema Espectroscopias : Emisión Atómica Absorción," pp. 1–30, 2012, [Online]. Available: <http://www.uco.es/~iq2sagrl/TranspEspectrosc.pdf>.
- [16] R. F. Storey, A. B. Donnalley, and T. L. Maggio, "Real-time monitoring of carbocationic polymerization of isobutylene using in situ FTIR-ATR spectroscopy with conduit and diamond-composite sensor technology," *Macromolecules*, vol. 31, no. 5, pp. 1523–1526, 1998, doi: 10.1021/ma971293s.
- [17] F. Rojo, "Tablas de Espectroscopía Infrarroja," *Fac. Química - Dep. Programas Audiovisuales*, p. 11, 2000, [Online]. Available: [http://depa.fquim.unam.mx/amyd/archivero/TablasIR\\_15437.pdf%0Ahttp://depa.fquim.unam.mx/amyd/archivero/IRTablas\\_33080.pdf](http://depa.fquim.unam.mx/amyd/archivero/TablasIR_15437.pdf%0Ahttp://depa.fquim.unam.mx/amyd/archivero/IRTablas_33080.pdf).
- [18] J. B. Ruiz Carbajal, "Reconocimiento de Picos y Eliminación de Ruidos de Espectros Raman de Muestras Químicas y Biológicas," *Inst. Nac. Astrofísica, Óptica y Electrónica*, p. 129, 2012, [Online]. Available: <https://inaoe.repositorioinstitucional.mx/jspui/bitstream/1009/773/1/RuizCJB.pdf>.
- [19] R. M. y R. G. José Luis Pérez, "ESPECTROSCOPÍAS INFRARROJA Y RAMAN José Luis Pérez , Rogelio Murillo y Raúl Gómez," 2011.
- [20] F. D. E. La, A. La Espectroscop, A. Inductivo, I. Optima, D. V. P. Elmer, and A. Paar, "Espectroscopía de emisión atómica icp-oes," p. 3, 2019.
- [21] D. Bp, J. Continental, D. Hydrochloride, G. Simone, and D. Tpo, "Safety data sheet Safety data sheet," *Carbon N. Y.*, vol. 1173, no. i, pp. 1–8, 2005.
- [22] Y. Fei *et al.*, "Response of soil enzyme activities and bacterial communities to the accumulation of microplastics in an acid cropped soil," *Sci. Total Environ.*, vol. 707, p. 135634, 2020, doi: 10.1016/j.scitotenv.2019.135634.
- [23] J. Zou, X. Liu, D. Zhang, and X. Yuan, "Adsorption of three bivalent metals by four chemical distinct microplastics," *Chemosphere*, vol. 248, p. 126064, 2020, doi: 10.1016/j.chemosphere.2020.126064.

- [24] Q. Wang, Y. Zhang, X. Wangjin, Y. Wang, G. Meng, and Y. Chen, "The adsorption behavior of metals in aqueous solution by microplastics effected by UV radiation," *J. Environ. Sci. (China)*, vol. 87, pp. 272–280, 2020, doi: 10.1016/j.jes.2019.07.006.
- [25] J. Yang, L. Cang, Q. Sun, G. Dong, S. T. Ata-Ul-Karim, and D. Zhou, "Effects of soil environmental factors and UV aging on Cu<sup>2+</sup> adsorption on microplastics," *Environ. Sci. Pollut. Res.*, vol. 26, no. 22, pp. 23027–23036, 2019, doi: 10.1007/s11356-019-05643-8.
- [26] M. Ibrahim, D. Ph, H. He, and D. Ph, "Classification of polyethylene by Raman spectroscopy Author," *Thermo Fish. Sci.*, vol. 792, p. AN52301, 2017.
- [27] D. Videira-Quintela, S. F. Prazeres, F. E. Ortega-Ojeda, and G. Montalvo-García, "A comprehensive study of protein–mesoporous–macroporous silica interactions by extended canonical variate analysis of Raman spectra," *J. Raman Spectrosc.*, vol. 51, no. 2, pp. 335–345, 2020, doi: 10.1002/jrs.5773.
- [28] K. Silva and F. Diaz, "Identificación De Niveles De Toxicidad De Metales Pesados," *Dinámica Ambient.*, no. 2, 2018, [Online]. Available: <https://revistas.unilibre.edu.co/index.php/ambiental/article/view/5798/5387>