



FACULTAT  
**DE CIÈNCIES  
I TECNOLOGIA**

UVIC | UVIC·UCC

Treball de Fi de Grau

# TÈCNIQUES PER A L'ANÀLISI DE MICROPLÀSTICS

ANDREA SERRA CREUS

**Grau en Biotecnologia**

Tutor/a: Àngels Leiva Presa

Co-tutor/a: Mireia Bartrons Vilamala

Vic, Juny de 2020

# Agraïments

M'agradaria agrair a la gent que m'ha donat suport i m'ha ajudat en aquest Treball de Final de Grau. Primerament, agrair a GEA Research Group l'oportunitat de formar part del seu projecte i confiar amb les meves habilitats per proporcionar els coneixements suficients al grup per iniciar un nou camp d'investigació relacionat amb els microplàstics. Concretament agraeixo a l'Àngels Leiva, tutora principal del treball, per tota l'ajuda i predisposició durant aquest període, per l'emoció transmesa pel projecte i el caire perfeccionista a l'hora de plasmar tota la informació a la memòria. A la Mireia Bartrons, co-tutora del treball amb la qui he pogut comptar en qualsevol moment per a resoldre temes més tècnics i més específics de l'àrea. Ambdues, participants de GLEON han sigut el fil per poder participar en projecte GALACTIC, contribuint en l'obtenció de mostres. Tot i que per causes alienes, per el moment no s'ha posat en pràctica el mostreig al Pantà de Sau, agraeixo molt la oportunitat i estaré encantada en poder realitzar-ho tan aviat la situació ho permeti.

També m'agradaria agrair al Club Nàutic Vic Sau, especialment al senyor Albert qui ens va assessorar sobre la navegació al pantà i sobretot per mantenir-nos constantment informats de les condicions del pantà després del temporal Glòria.

Finalment, a la meua família, parella i amics els qui m'han aportat valentia, ànims i suport durant aquest projecte i durant tot el grau.

# Resum

**Títol:** *Tècniques per a l'anàlisi de microplàstics*

**Autora:** Andrea Serra Creus

**Tutors:** Dra. Àngels Leiva Presa (UVic – UCC) i Dra. Mireia Bartrons Vilamala (UVic – UCC)

**Data:** Juny de 2020

**Paraules clau:** *Microplàstics, residus plàstics, microplàstics en ecosistemes aquàtics, contaminació en ecosistemes aquàtics, tècniques d'identificació i quantificació de microplàstics*

L'impacte causat per l'alliberació continuada de microplàstics en els ecosistemes aquàtics ha creat gran interès per part de la comunitat científica, en aquests els últims anys. A causa del rang de mides que presenten els microplàstics, són una amenaça global per la fauna aquàtica dels embassaments i reservoris d'aigua dolça, fet que ha comportat el plantejament d'una nova línia d'investigació relacionada amb els microplàstics, per part del grup de recerca d'Ecologia Aquàtica (GEA) de la UVIC-UCC, els quals, entre altres línies de recerca, investiguen els impactes antropogènics en els ecosistemes aquàtics.

En aquest Treball de final de Grau, s'exposen els resultats de la revisió de les metodologies disponibles per a analitzar la presència i l'abundància de microplàstics en mostres d'aigua, amb la finalitat de valorar quines de les tècniques són les més adequades per l'anàlisi de microplàstics en els ecosistemes aquàtics. Aquesta cerca engloba tant els mètodes de mostreig i tractament de les mostres, com els mètodes capaços d'identificar i quantificar els microplàstics, confirmant que la microscòpia i l'espectroscòpia FTIR, les tècniques més adients per a dur a terme aquest tipus d'anàlisi.

De forma complementària, s'ha planificat un treball de camp fruit de la participació al projecte GALACTIC, liderat per GLEON (Global Lake Ecological Observatory Network). En concret, s'ha posat a punt un protocol de mostreig amb l'objectiu d'obtenir mostres del Pantà de Sau les quals seran analitzades de manera estandarditzada juntament amb mostres recollides per altres investigadors en altres embassaments d'arreu del món.

# Summary

**Title:** *Analytical techniques of microplastics*

**Author:** Andrea Serra Creus

**Supervisor:** Dra. Àngels Leiva Presa (Uvic UCC) i Dra. Mireia Bartrons Vilamala (Uvic UCC)

**Date:** Juny de 2020

**Keywords:** *Microplastics, plastic debris, microplastics in water or in freshwater systems, water pollution, identification techniques and quantifying techniques of microplastics*

The impact of the continued release of microplastics in the water environment, interested the scientific community during the last years. Due to their size range, is a global hazard for the aquatic fauna. This fact made the research think in a new line related with microplastics by GEA Research Group – Aquatic Ecology (UVIC-UCC). Who research, among others research lines, about the anthropologic impacts in aquatic environments.

This Final Degree Project shows the results of available methodologies to analyze the presence and bountiful quantity of microplastics in water samples in order to value which techniques are the most suitable ones to analyze microplastics in aquatic environments. In this search include the sampling methods, pre-treatment methods and the ones that identify and quantify microplastics. They confirm that Microscopy and FTIR spectroscopy are the best ones to carry out this sort of analysis.

Furthermore, a fieldwork has been performed in participation with GALACTIC project from the research group GLEON (Global Lake Ecological Observatory Network). A sampling protocol was established in order to obtain samples from Pantà de Sau which will be analyzed in the standardized way along with samples collected by other researchers in different lakes and reservoirs around the world.

# Índex de Continguts

<b>1. Introducció</b> .....	<b>1</b>
1.1 Els Microplàstics .....	1
1.1.1 Origen .....	2
1.1.2 Distribució .....	2
1.1.3 Impactes ecològics .....	3
1.1.4 Legislació i recomanacions actuals .....	3
<b>2. Objectius</b> .....	<b>5</b>
<b>3. Revisió literària</b> .....	<b>6</b>
3.1 Metodologia .....	6
3.2 Resultats obtinguts a la cerca .....	6
3.2.1 Obtenció de mostres .....	7
3.2.1.1 Xarxes d'arrossegament .....	8
3.2.2 Tractament de les mostres .....	8
3.2.2.1 Eliminació de residus .....	8
3.2.2.1.1 Digestió de la matèria orgànica .....	9
3.2.2.2 Extracció dels microplàstics .....	10
3.2.2.2.1 Separació per densitat .....	10
3.2.2.2.2 Filtració .....	10
3.2.2.2.3 Cribratge .....	12
3.2.3 Identificació de microplàstics .....	12
3.2.3.1 Caracterització dels microplàstics .....	12
3.2.3.2 Tècniques visuals .....	15
3.2.3.2.1 "The Hot Needle Test" .....	15
3.2.3.2.2 Tècniques de microscòpia .....	16
3.2.3.2.1.1 Tincions .....	16
3.2.3.2.1.2 Microscòpia electrònica de rastreig (en anglès SEM) .....	17
3.2.3.3 Tècniques d'espectroscòpia .....	18
3.2.3.3.1 Espectroscòpia d'infrarojos i transformació de Fourier .....	18
3.2.3.3.2 Espectroscòpia de Raman .....	19
3.2.3.4 Degradacions termals .....	20
3.2.3.4.1 Piròlisi - Cromatografia Gas - Espectrometria de masses (Py-GC/MS) .....	21
3.2.3.4.2 Extracció-desorció termal automatitzada i Escaneig calorimètric diferencial .....	22

3.2.3.5	Altres .....	22
3.2.4	Quantificació de microplàstics.....	23
3.2.5	Contaminació de les mostres .....	24
3.2.5.1	Durant el mostreig.....	24
3.2.5.2	Durant el tractament de les mostres .....	24
3.3	Discussió de resultats .....	25
<b>4.</b>	<b>Treball de camp .....</b>	<b>29</b>
4.1	GLEON. Projecte GALACTIC.....	29
4.2	Mostreig al Pantà de Sau .....	30
4.2.1	Zona de mostreig.....	30
4.2.2	Data de mostreig .....	30
4.2.3	Material pel mostreig.....	31
4.2.4	Protocol de mostreig.....	31
4.2.4.1	Abans del mostreig.....	31
4.2.4.2	Durant el mostreig.....	32
4.2.4.3	Després del mostreig .....	33
4.2.5	Discussió.....	33
<b>5.</b>	<b>Conclusió.....</b>	<b>34</b>
<b>6.</b>	<b>Bibliografia .....</b>	<b>35</b>

# Llista de taules

<b>Taula 1: Taula dels polímers més habituals i les seves aplicacions (Pinto da Costa et al, 2019).....</b>	<b>2</b>
<b>Taula 2: Tècniques d'identificació visual: límit de detecció i particularitats. ....</b>	<b>15</b>
<b>Taula 3: Tècniques d'espectroscòpia: límit de detecció i particularitats.....</b>	<b>18</b>
<b>Taula 4: Degradacions termals: límit de detecció i particularitats.....</b>	<b>21</b>
<b>Taula 5: Taula resum de les tècniques quantitatives i qualitatives per a l'anàlisi de microplàstics (Peñalver et al., 2020).....</b>	<b>28</b>

# Llista de figures

<b>Figura 1: Equip de filtració combinat a una comba de buit. ....</b>	<b>11</b>
<b>Figura 2: Sedàs d'acer inoxidable 50µm.....</b>	<b>12</b>
<b>Figura 3: Morfologies dels microplàstics (C. Li et al., 2020).....</b>	<b>14</b>
<b>Figura 4: Imatges de diferents morfologies de microplàstics obtingudes amb SEM. A). fibra, B). fragment, C). grànul, D). làmina i E) escuma. ....</b>	<b>17</b>
<b>Figura 5: A). Comparació d'imatges de Raman i IR. B). Espectres de Raman i IR en comparació l'espectre de referència del polipropilè (PP) (Araujo et al., 2018).....</b>	<b>20</b>
<b>Figura 6: Geografia del Pantà de Sau amb les zones de mostreig senyalitzades. ....</b>	<b>30</b>
<b>Figura 7: Xarxa d'arrossegament CP3-50 (30cmØx90cmL 300µm CP3- 50 'Aquatic Biotechnology'), per a la recolecció de mostres en superfícies d'aigua i anàlisi de microplàstics. ....</b>	<b>31</b>
<b>Figura 8: Posició de la xarxa d'arrossegament durant el mostreig. ....</b>	<b>33</b>
<b>Figura 9: Exemple de la marca a realitzar a la boca de la xarxa per delimitar l'àrea de filtrat (GALACTIC, 2020). ....</b>	<b>ii</b>
<b>Figura 10: Imatge mostrant la localització de la xarxa d'arrossegament durant les acitivitats de mostreig (GALACTIC, 2020).....</b>	<b>ii</b>



# Llista d'abreviatures

ATR-FTIR	Espectroscòpia d'infrarojos - transformació de Fourier – reflectància total atenuada
BPC	Bifenil policlorat
CA	Acetat de cel·lulosa
DSC	Escaneig calorimètric diferencial
DTT	Diclorodifeniltricloroetà
FPA-FTIR	Espectroscòpia d'infrarojos - transformació de Fourier – matriu en plànols focals
FTIR	Espectroscòpia de rajos infrarojos - transformació de Fourier
HAP	Hidrocarburs aromàtics policíclics
HDPE	Polietilè d'alta densitat
HPLC	Cromatografia líquida d'alta resolució
IR	Espectroscòpia de rajos infrarojos
LDPE	Polietilè de baixa densitat
Micro-FTIR	Microespectroscòpia de rajos infrarojos - transformació de Fourier
PA	Poliamida
PE	Polietilè
PET	Polietilè tereftalat
PP	Polipropilè
PS	Poliestirè
PVC	Polivinil clorat
RM	Microscòpia de Raman
SEM	Microscòpia electrònica de rastreig
SEM-EDS	Microscòpia electrònica de rastreig – Espectroscòpia d'energia dispersiva
SEM-XEDS	Microscòpia electrònica de rastreig – Espectroscòpia d'energia dispersiva de rajos X
Py-GC/MS	Piròlisi – Cromatografia Gas – Espectrometria de masses
TED-GC/MS masses	Extracció-desorció termal automatitzada – Cromatografia Gas – Espectrometria de masses
TGA	Termogravimetria

## 1. Introducció

El plàstic és un material indispensable en la vida quotidiana actual a causa de la seva flexibilitat, resistència a la corrosió, baixa conducció tèrmica i baix cost. Es fan servir especialment per a la fabricació de productes d'un sol ús. Però la dificultat que suposa reciclar el plàstic juntament amb el baix índex de degradació, predispesa una acumulació d'aquest en el medi ambient, essent un gran problema emergent.

La producció a gran escala d'aquest material va començar en el 1950 i ha seguit creixent exponencialment durant les últimes dècades. Segons PlasticsEurope, 2018, s'ha assolit una producció mundial de 350 milions de tones en el 2017 i segons les estadístiques es preveu arribar a una producció anual de 33 bilions de tones al 2050. A més, degut al baix índex de reciclatge, s'estima que entre 1.2 i 2.4 milions de tones de residus plàstics són alliberats als ecosistemes aquàtics cada any (Fok et al., 2019).

Encara que disposen d'una alta estabilitat física, els plàstics amb el temps acostumen a patir processos de fragmentació, canvis físics i químics que engloben la foto-oxidació i la degradació química entre d'altres, que els converteixen en petits fragments anomenats microplàstics.

### 1.1 Els Microplàstics

Tot i que no es disposava d'una definició estandarditzada del concepte microplàstic, durant la jornada *First International Workshop on the occurrence effects and fate of microplastic marine debris*, al 2008 organitzada per NOAA (National Oceanic and Atmospheric Administration) dels Estats Units, es va arribar un acord on definien el criteri per caracteritzar els microplàstics. La mida llongar es va acotar a partícules inferiors a 5mm. Per altra banda, l'Agència Europea de Substàncies i Mescles Químiques (ECHA), va ampliar la definició incloent els criteris de: tipus de substància, polímers sintètics o modificats químicament, en estat sòlid o semi sòlid. A més, aquests polímers poden presentar diferents morfologies com grànuls, fibres, fragments, làmines i espumes.

D'ençà que es va començar a utilitzar el terme 'microplàstic', el nombre de publicacions ha augmentat exponencialment confirmant l'acceptació i l'interès per part de la comunitat científica.

Hi ha més de 5000 tipus de polímers sintètics, dels quals més del 80% són polipropilè (PP), polietilè (PE), clorat de polivinil (PVC), tereftalat de polivinil (PET) i poliestirè (PS) (Rios Mendoza & Balcer, 2019). Segons les seves característiques, tenen aplicacions diferents, les quals es mostren a la *Taula 1*.

Taula 1: Taula dels polímers més habituals i les seves aplicacions (Pinto da Costa et al, 2019).

Tipus de polímer	Aplicacions
Polietilè tereftalat (PET)	Fibres sintètiques, ampolles d'aigua.
Polietilè d'alta densitat (HDPE)	Ampolles d'aigua, joguines.
Polivinilclorat (PVC)	Embolcalls de menjar, ampolles, instrumental mèdic, xarxes de pesca, flascons.
Polietilè de baixa densitat (LDPE)	Bosses de plàstic, films i plàstics d'un sol ús.
Polipropilè (PP)	Recipients de plàstic, tapes i embolcalls de plàstic.
Poliestirè (PS)	Material de construcció, plats i utensilis d'un sol ús, embolcalls, joguines, caps dels DVD.

### 1.1.1 Origen

Segons el seu origen, els microplàstics es poden classificar en primaris i secundaris. Els que provenen de fonts primàries es poden trobar en el tèxtil, medicaments, cosmètics i també en els pellets utilitzats com a matèria primera per a la producció de plàstics. Les fonts secundàries deriven la descomposició de residus plàstics com recipients, xarxes, fibres i pneumàtics, a causa de tot un seguit de processos com la meteorització, la radiació UV, hidròlisis i degradació microbiana, entre d'altres (Xu et al., 2020).

Els microplàstics primaris són alliberats en rius i reservoris d'aigua generalment degut a l'ús domèstic i a les indústries, però són els microplàstics secundaris els que es consideren els causants del gran impacte ambiental ja que la seva abundància ha augmentat exponencialment a causa de l'entrada continuada d'aquests residus plàstics en els ecosistemes (Hidalgo-Ruz et al., 2012).

### 1.1.2 Distribució

S'ha reportat la presència de plàstics en diferents ambients. En ecosistemes aquàtics i terrestres com en els sediments, biota i aigua i en diferents regions de planeteta, inclús en zones polars.

En els ecosistemes aquàtics, els microplàstics es poden disposar flotant a la superfície o bé dispersar-se a les profunditats acumulant-se en els sediments. La densitat és un dels paràmetres que afecten a la distribució dels microplàstics. En el cas del PE i PP, que presenten densitats inferiors a  $1\text{g/cm}^3$ , es troben sobretot en la superfície, mentre que PS amb una densitat similar a la del PVC i PET,  $1.3\text{-}1.7\text{g/cm}^3$ , es disposen en les capes més profundes, ja que la seva densitat és superior a la de l'aigua.

Però també existeix una correlació entre la presència de certs tipus de microplàstics i l'activitat humana realitzada a la zona.

### 1.1.3 Impactes ecològics

A causa de la seva mida petita, gran part dels organismes es veuen afectats per la presència de microplàstics. Els polímers i els seus productes de degradació són consumits per una gran varietat d'organismes aquàtics, des d'invertebrats fins a peixos, que accidentalment ingereixen aquests polímers introduint els microplàstics a la cadena tròfica. Els efectes causats, estan relacionats amb lesions mecàniques, reducció en el creixement o disminució de la fecundació (Bollaín Pastor & Vicente Agulló, 2019).

És habitual durant el procés de fabricació dels plàstics la utilització d'additius per a millorar la qualitat del producte final. La *International Agency for Research on Cancer* (IARC), va incloure alguns plàstics, components o derivats dels plàstics a la llista de carcinògens, tot i que el clorur de polivinil (PVC) i el poliestirè (PS) no estan categoritzats com a components cancerígens pels humans, el clorur de vinil, l'estirè i alguns derivats del ftalats sí que es consideren cancerígens.

Les característiques físiques i químiques que presenten els microplàstics, entre elles la seva hidrofobicitat i l'elevada relació superfície-volum, faciliten l'absorció de contaminants i tòxics (Wang & Wang, 2018), per al que actuen com a vehicle de transport per a contaminants tals com BPCs (policlorats de bifenils), HAPs (hidrocarburs aromàtics policíclics) o el DDT (diclorodifeniltricloroetà).

La ingesta de microplàstics per part dels organismes evidencia l'impacte tant físic com de toxicitat per la fauna aquàtica ja que els microplàstics permeten la incorporació de compostos químics com additius, metalls pesants, entre d'altres, a la cadena tròfica (Naik et al., 2019).

Tenint present que els humans som l'últim consumidor de la xarxa tròfica, la introducció de microplàstics en els humans és possible a causa del consum de peixos i marisc, però també via l'aigua de consum.

### 1.1.4 Legislació i recomanacions actuals

L'Organització de les Nacions Unides, l'ONU, amb el seu Programa de les Nacions Unides per al Medi Ambient, UNEP, amb el que coordina les activitats relacionades amb el medi ambient i a més, ofereix ajuda als països per implementar polítiques mediambientals sostenibles, té una gran implicació en estudis, guies i recomanacions per afrontar el problema dels microplàstics i les seves conseqüències, principalment en entorns marins. Van publicar dues guies, al 2015 i al 2016 respectivament, centrant-se en els residus plàstics i la seva problemàtica, destacant informes publicats per GESAMP (*Joint Group of Experts on the Scientific Aspects of Marine Environmental Protection*), sobre l'origen i els efectes dels microplàstics, també en entorns marins.

L'Oficina Regional de l'OMS d'Europa va publicar el setembre de 2017 un document per actualitzar la *Directiva europea relativa a la qualitat d'aigües destinades al consum humà*, però en aquestes no es tractaven el microplàstics com a tal, sinó que es parlava dels nanomaterials en contacte amb l'aigua.

La UE, se centra principalment en risc mediambiental dels microplàstics. El 2018 la Comissió Europea va publicar un comunicat anomenat *A European Strategy for Plastics in a Circular Economy*, principalment proposant accions per disminuir els impactes dels plàstics en el medi

ambient. Van proposar una millora del tractament d'aigües residuals i van destacar la necessitat de detectar els microplàstics presents en aigües pel consum humà. Com a conseqüència, el Parlament Europeu va adoptar mesures per a prohibir alguns dels productes plàstics d'un sol ús, com coberts, plats, gots, etc., i incentivar a les indústries per desenvolupar nous materials i conscienciar a la població sobre l'impacte ambiental dels residus plàstics.

L'Agència Europea de Substàncies y Mescles Químicas (ECHA) va publicar el 2018 la monografia *Note on substance identification and the potential scope of a restriction on uses of microplastics*, per avaluar la restricció de substàncies i mescles químiques. A més, va recopilar evidències científiques per avalar les recomanacions a la Comissió Europea per a la restricció del ús de microplàstics. Com a resultat d'aquestes actuacions, al 2019 es va presentar la proposta per restringir l'ús en substàncies utilitzades en medicina, productes cosmètics i d'higiene, pintures, revestiments i materials per a la construcció i l'agricultura.

Són moltes les institucions que estan lluitant per aconseguir legislar la presència de microplàstics en els diferents ecosistemes, però pel moment no existeix cap regulació que estipuli els nivells màxims de microplàstics en aigües de consum humà. Tot hi que ha estat descrit que les depuradores no tenen capacitat d'eliminar la totalitat dels microplàstics, alguns estudis han demostrat reduir els nivells un 83%, essent els fragments de inferiors a 50 µm, els més difícils d'eliminar. Tot i l'alarma social causada pels impactes dels microplàstics a la salut humana, un estudi realitzat a la zona de Oldenburg-East-Frisian (Alemania) indica la presència de microplàstics tant en aigua pel consum humà i en aigües tractades en una depuradora, és baixa, 0.7 partícules/m<sup>3</sup>, considerat un valor pràcticament insignificant (Bollaín Pastor & Vicente Agulló, 2019). Però també cal tenir present que es tracta d'una zona concreta i que el volum de mostra analitzada és molt petit, per això és de vital importància orientar futurs estudis en la detecció de microplàstics per determinar-ne l'abundància en els diferents ambients.

## 2. Objectius

Aquest Treball de Final de Grau té com a objectiu principal, proporcionar una visió clara de la definició dels microplàstics, de la seva classificació i de les metodologies de mostreig i d'anàlisi disponibles, per determinar la millor manera de quantificar els microplàstics presents en els ecosistemes aquàtics. Per fer-ho, s'ha plantejat els següents sub-objectius:

- ❖ Realitzar una cerca bibliogràfica que proporcioni informació detallada de les metodologies de mostreig i les tècniques d'anàlisi, tant qualitatives com quantitatives, per tal d'analitzar els microplàstics presents en mostres d'aigua. Aquest treball s'ha dut a terme amb col·laboració amb el Grup de Recerca en Ecologia Aquàtica (GEA) de la UVIC-UCC. Des de fa un any, el grup està iniciant projectes per estudiar els impactes dels microplàstics en els sistemes aquàtics, pel que aquest TFG pretén englobar i complementar la informació de la qual es disposa. Hi ha altres TFG en marxa, els quals també es podran beneficiar dels resultats obtinguts en aquest treball.
- ❖ De caràcter més pràctic, la col·laboració del GEA amb GLEON (Global Lake Ecological Observatory Network), té com a objectiu optimitzar el protocol de mostreig per a dur-lo a terme en embassaments i reservoris d'aigua dolça, així com proporcionar a GLEON les mostres obtingudes per obtenir dades que permetin estandarditzar protocols a nivell mundial. Aquesta participació ha permès formar part de l'estandardització d'una metodologia de mostreig que es pretén aplicar en els projectes del GEA centrats amb microplàstics.

### 3. Revisió literària

En aquest treball s'ha realitzat una extensa revisió de publicacions científiques relacionades amb els mètodes utilitzats per a l'anàlisi de microplàstics en mostres d'aigua. L'estudi dels microplàstics presents en un ecosistema aquàtic engloba l'obtenció de les mostres, el tractament d'aquestes i la seva anàlisi. Per a aquesta anàlisi s'utilitzen tècniques d'anàlisi qualitativa i quantitativa que permeten caracteritzar els microplàstics presents en les mostres i determinar-ne l'abundància relativa, respectivament.

#### 3.1 Metodologia

Per a la cerca bibliogràfica s'han tingut en compte principalment revisions publicades en bases de dades com, *Science Direct*, *Pubmed* i *Google Scholar*.

S'han utilitzat un seguit de paraules clau per acotar la cerca, incloent-hi '*Microplastics*', '*Plastic debris*', '*Microplastics in water*' o '*in freshwater systems*', '*water pollution*', '*identification techniques of microplastics*' i '*quantifying techniques of microplastics*'.

El criteri de selecció es va acotar en revisions sobre anàlisi de microplàstics en sistemes aquàtics, centrant la cerca en sistemes d'aigua dolça, així com rius, embassaments i llacunes, incloent-hi els mètodes de recol·lecció de mostres i el tractament d'aquestes. Com que les publicacions en què es tracten aigües dolces són escasses, s'han tingut també en compte estudis en ecosistemes marins.

Segons el criteri esmentat, un total de 54 publicacions van ser prèviament seleccionades. D'aquestes se'n varen escollir 26, aquelles que presentaven una informació actual de les tècniques aplicades a l'anàlisi de microplàstics, cobrint un període comprès entre els anys 2011 i 2020. La majoria d'aquestes referències són treballs publicats a partir de l'any 2018.

El total de documents seleccionats en la cerca es van organitzar en publicacions relacionades amb obtenció de mostres, amb el tractament de les mateixes i en metodologies d'anàlisi qualitatives i quantitatives. Posteriorment, es van llegir els resums per confirmar l'interès del document i descartar informació no relacionada i redundat, sempre donant prioritat a les publicacions més recents. Un cop triades les referències, es varen llegir les publicacions detalladament, ressaltant els apartats d'interès.

L'eina *Mendeley*, com a programa gestor de referències, es va utilitzar per facilitar l'organització de bibliografia i la gestió de cites al llarg del treball.

#### 3.2 Resultats obtinguts a la cerca

Els resultats de la cerca centrada en l'anàlisi de microplàstics en sistemes aquàtics, s'ha classificat en quatre apartats: (i) l'obtenció i recollida de mostres, (ii) preservació i tractament de les mostres al laboratori i especialment, (iii) tècniques utilitzades per a la identificació, caracterització i (iv) quantificació de microplàstics.

### 3.2.1 Obtenció de mostres

Degut a l'àmplia distribució dels microplàstics en els diferents ecosistemes, existeixen diverses matrius de les quals és possible obtenir mostres amb l'objectiu d'analitzar presència de microplàstics. Pel que es requereixen diferents metodologies d'obtenció de mostres d'aigua, sediments i biota.

Les tècniques més utilitzades per a la recol·lecció de mostres d'aigua són les següents: mostreig selectiu, mostres íntegres i mostreig amb reducció de volum (Hidalgo-Ruz et al., 2012).

- ❖ El mètode selectiu per la recollida de plàstics únicament és aplicable quan els plàstics són prou grans (>500µm) per ser observats a simple vista i s'extreuen de la matriu de forma manual. La limitació principal del mètode és la mida dels fragments: aquests poden estar emmascarats entre restes d'altres materials i conseqüentment desestimar-ne una part. Aquest mètode no acostuma a proporcionar resultats representatius de la zona de mostreig.
- ❖ Les mostres íntegres es recol·lecten obtenint fraccions completes d'aigua on no hi ha cap classe de reducció del volum durant el mostreig. Aquest mètode permet recol·lectar mostres sense discriminar la mida i visibilitat de les partícules, però per contra, el volum de la mostra obtingut és relativament petit, fet que pot afectar negativament a la representativitat de la mostra. Per a solucionar aquesta limitació, alguns autors recomanen la recollida de mostres de diferents punts de la zona d'estudi.
- ❖ En el mostreig amb reducció de volum s'utilitzen xarxes que permeten filtrar grans quantitats d'aigua amb la qual cosa augmenta molt la cobertura de la zona de mostreig (Wang & Wang, 2018). A més, el volum de mostra obtingut és menor i a la vegada més representatiu. Cal tenir molt present el tipus de xarxa utilitzada, així com la mida de porus ja que aquesta determinarà la mida de partícules que seran recol·lectades i per tant, posteriorment analitzades.

Pel fet de proporcionar uns resultats més representatius, el mostreig amb reducció de volum és el més recomanat per a obtenir mostres en ecosistemes aquàtics.

El mostreig es pot realitzar en diferents profunditats de la columna d'aigua, en zones pelàgiques i en zones bentòniques. D'acord amb això, en la literatura revisada existeixen diversos protocols de mostreig. Així i tot, cal esmentar que en les publicacions no sempre es detalla ni el procediment utilitzat ni la profunditat de realització del mostreig, però sí la mida de porus de la malla i el volum d'aigua mostrejat.

Gran part de les partícules plàstiques presents en els ecosistemes aquàtics es troben flotant a la superfície ja que presenten una baixa densitat, pel que la recollida de mostres d'aigua superficial permet l'estudi de microplàstics de baixa densitat. Aquelles que presenten majors densitats tendeixen a dipositar-se a les profunditats i acostumen a analitzar en mostres de sediments.



### 3.2.1.1 Xarxes d'arrossegament

Les xarxes d'arrossegament són els equips més utilitzats per a la recollida de microplàstics en aigües superficials. Inicialment, van ser dissenyades per a recol·lectar plàncton però en els últims anys també han estat utilitzades per a l'estudi de microplàstics, gràcies al fet que aquests presenten rangs de mides similars. El desavantatge d'utilitzar xarxes pensades per a l'estudi de plàncton és el material amb el qual estan fetes: són d'un material plàstic, habitualment de PVC (clorur de polivinil), fet que pot interferir en els resultats.

Les xarxes permeten mostrejar grans quantitats d'aigua, sobretot quan són utilitzades recurrentment amb una barca la zona de mostreig. Les més sofisticades disposen d'equips per mesurar el cabal d'aigua filtrat en cada mostreig. Els equips que no en disposen per al que el volum d'aigua filtrat serà calculat a partir de la mida de porus de la xarxa i la distància recorreguda en el mostreig (Cutroneo et al., 2020).

Les xarxes poden tenir l'obertura en forma circular o bé rectangular i a més, presentar dimensions diferents, però al final de la xarxa totes disposen d'una gerra de recollida, on es concentra la mostra.

La mida de porus de les xarxes d'arrossegament, determinen la mida de les partícules que seran retingudes (Fok et al., 2019), però fins al moment, no hi ha cap mida estipulada. La mida més comuna és de 300µm, tot i que el rang varia 50 µm i 3mm. En funció de la mida de porus utilitzada, es desestimen grans quantitats de partícules de mides inferiors però per altra banda, el fet d'utilitzar xarxes de 50-80µm, predisposa a una ràpida obstrucció. Segons Bergmann et al., (2015), es recomana no realitzar mostres en èpoques de creixement del plàncton degut a la facilitat d'obstrucció de les xarxes del mateix plàncton.

## 3.2.2 Tractament de les mostres

Un cop obtingudes les mostres, s'acostumen a aplicar tractaments per a preservar-les abans de la seva anàlisi. L'objectiu és eliminar els materials no plàstics, així com minerals i matèria orgànica (Pinto da Costa et al., 2019), que podrien interferir en l'anàlisi de les mostres. Aquests tractaments previs, també engloben l'extracció dels microplàstics de les mostres d'aigua.

### 3.2.2.1 Eliminació de residus

En tots els estudis, l'examinació visual de les mostres ja tractades és un pas necessari per separar altres fragments no plàstics com, closques, restes d'animals, algues, restes de metalls, pintures, quitrans o vidre, entre d'altres (Hidalgo-Ruz et al., 2012). Molts d'aquests materials poden ser identificats a simple vista a causa del seu color, mida o textura i a la vegada ser descartats abans de procedir amb la identificació pròpiament dita. Aquests materials, abans de ser eliminats es poden rentar, inclús sotmetre'ls a ultrasons per despendre possibles substàncies adherides. No sempre és possible realitzar una separació visual, ja que les partícules han de ser suficientment grans per ser observades i recol·lectades i a la vegada cal estar molt segur de l'origen no plàstic dels fragments abans de descartar-los.

La matèria orgànica és una de les causes principals del deteriorament de les mostres, per el que es necessari extreure-la poc temps després de la seva obtenció.

#### 3.2.2.1.1 Digestió de la matèria orgànica

La digestió de mostres és un procés habitual realitzat per eliminar la matèria orgànica present a la mostra, és a dir com a tècnica de purificació. Habitualment aquesta es realitza al laboratori. Podem parlar de dos tipus de digestions, la química i l'enzimàtica.

##### ❖ Digestions químiques

El mètode d'eliminació de matèria orgànica més utilitzat és l'addició de peròxid d'hidrogen ( $H_2O_2$ ), que oxida la matèria orgànica present a la mostra de forma senzilla i eficaç, sense interferir en els microplàstics (J. Li et al., 2018). Són comunament utilitzades les solucions de peròxid d'hidrogen al 30%, habitualment combinades amb un catalitzador de ferro, on es produeix a la reacció de Fenton, donant lloc a l'obtenció de grans quantitats d'hidroxils lliures amb un gran potencial d'oxidació.

Els àcids no oxidants com l'àcid clorhídric (HCl) acostuma a no ser suficient, ja que s'ha comprovat que després de la digestió encara romanen residus orgànics. Però per contra, àcids forts i oxidants, com l'àcid sulfúric ( $H_2SO_4$ ) o l'àcid nítric ( $HNO_3$ ), poden dividir els microplàstics en fragments mes petits, sobretot en polímers amb poca tolerància al pH (J. Li et al., 2018), per exemple la poliamida (PA).

Una altra opció amb gran potencial, són les digestions bàsiques, com per exemple, solucions d'hidròxid de sodi (NaOH) o hidròxid de potassi (KOH). Stock et al., (2019) segons les observacions de Cole et al. (2011) van demostrar que la solució 1M NaOH era capaç d'extreure el 90% dels microplàstics de les mostres, a més l'eficàcia es va veure augmentada amb l'increment de temperatura i molaritat de la mostra. Però per contra, alguns polímers com PC, acetat de cel·lulosa (CA), PET i PVC es varen veure degradats durant el procés (Cole et al., 2011; Stock et al., 2019). Les digestions bàsiques poden provocar canvis de color d'algunes de les partícules plàstiques, de la mateixa manera que ho fan la majoria de solucions àcides.

Segons J. Li et al. (2018) alguns autors proposen combinar àcids i bases per degradar un rang més ampli de compostos, millorar la digestió i l'eficàcia de recuperació.

##### ❖ Digestions enzimàtiques

Les digestions enzimàtiques són caracteritzades per ser menys agressives i, a diferència de les digestions químiques, són innòcues per a les partícules plàstiques. Però l'eficàcia varia en funció de la matèria orgànica present a la mostra. Per el que, segons Prata et al. (2019), alguns protocols combinen aquests tipus de digestions amb solucions  $H_2O_2$  al 30%.

Karlsson et al. (2017) va utilitzar proteïnasa-K amb clorur de calci ( $CaCl_2$ ), incubant 2 h a  $50^\circ C$  posteriorment va afegir d'una solució de  $H_2O_2$  al 30%, fet que el va permetre digerir amb una eficiència del 97% sense interferir a la mostra (Prata et al., 2019). La principal desavantatge de la utilització de proteïnasa-K és l'elevat cost d'adquisició i la complexitat del protocol de digestió. Com a alternativa, altres autors varen utilitzar enzims més

econòmics com la tripsina, col·lagenasa i papaïna, que tampoc van mostrar efectes sobre els microplàstics. Altres enzims com proteases, lipases i cel·lulases també han estat utilitzades per a digerir la matèria orgànica de les mostres, però son caracteritzades per realitzar la digestió amb un període de temps llarg, més de 10 dies. Caldria tenir en compte, que aquest fet podria comportar contaminació i pèrdua de mostra (Bretas Alvim et al., 2020).

Hi ha molt debat entre els investigadors sobre la possible degradació durant la purificació de microplàstics, per al que es recomana la utilització de controls per verificar la qualitat de la mostra després del tractament realitzat.

### 3.2.2.2 Extracció dels microplàstics

Per analitzar els microplàstics presents a les mostres és necessari extreure'ls de la seva matriu, segons el nostre objectiu d'estudi, de l'aigua. Existeixen diferents tècniques que permeten extreure microplàstics, la separació per densitat, la filtració i el cribratge.

#### 3.2.2.2.1 Separació per densitat

La separació de microplàstics per densitat contempla l'addició de solucions salines saturades, que permeten separar les partícules amb una densitat inferior. S'agita la mostra i a causa de la baixa densitat dels microplàstics, romanen mes temps en suspensió, fet que permet recollir-los del sobrenedant per decantació o be per filtració. Aquesta tècnica és molt recomanada per a la separació de microplàstics ( $0.8-1.6\text{g/cm}^3$ ) presents en mostres de sediments, ja que la diferencia de densitats entre els sediments ( $2.7\text{g/cm}^3$ ) i els microplàstics ( $0.8$  i  $1.6\text{g/cm}^3$ ), permeten realitzar una separació molt efectiva (Prata et al., 2019).

La solució més utilitzada és la de clorur sòdic, NaCl, amb una densitat d'aproximadament  $1.2\text{g/cm}^3$ . És una sal barata i no és perillosa ni contaminant pel medi ambient. Permet extreure plàstics de baixa densitat, com per exemple el polipropilè (PP,  $0.85-0.94\text{g/cm}^3$ ), el polistirè (PS,  $1.04-1.1\text{g/cm}^3$ ) i polietilè (PE,  $0.917-0.965\text{g/cm}^3$ ), mentre que la separació de microplàstics mes densos, com el polivinil clorat (PVC) i el polietilè tereftalat (PET), es menys eficient, donant lloc a la subestimació dels resultats.

Per a extreure un rang mes ampli de mides de microplàstics també s'han utilitzat com a alternativa o bé addicionalment, solucions salines d'alta densitat, com per exemple el iodur de sodi (NaI,  $1.8\text{g/cm}^3$ ) o clorur de zinc ( $\text{ZnCl}_2$ ,  $1.5-1.7\text{g/cm}^3$ ). Aquestes sals generalment són més cares i es caracteritzen contaminar el medi ambient. Alguns estudis, han pogut comprovar que la reutilització de la solució salina repetint el procés d'extracció, n'augmenta l'eficiència i es redueix l'impacte ambiental (Wang & Wang, 2018).

#### 3.2.2.2.2 Filtració

La filtració és una de les tècniques més utilitzades per a la separació de microplàstics en mostres d'aigua, ja sigui de mostres integres, separades per densitat, digerides i també mostres obtingudes amb reducció de volum. La filtració separa els sòlids i els líquids utilitzant un filtre i fent passar el líquid a través (Prata et al., 2019). Les partícules retingudes al filtre poden ser separades per poder ser visualitzades i caracteritzades.

L'equip de filtració es pot combinar a una d'una bomba de buit, tal i com es mostra a la *Figura 1*, o bé realitzar la filtració per gravetat. Es poden utilitzar diferents filtres, com els de fibra de vidre, policarbonat, poliamida, niló, d'acetat de cel·lulosa, nitrat de cel·lulosa, entre d'altres.



Figura 1: Equip de filtració combinat a una comba de buit.

La mida de porus del filtre determina la mida de les partícules retingudes. Cal tenir present però, que com menor sigui la mida del porus, augmenta la tendència a l'obstrucció dels filtres. No hi ha mesures de porus estandarditzades de filtres, les mides utilitzades varien entre  $0.2\mu\text{m}$  i  $300\mu\text{m}$  i el diàmetre del filtre entre 45mm i 47mm, depenent dels rangs de mides de microplàstics que es volen estudiar. Aquest fet, dificulta la comparació entre els diferents estudis.

Tot i que la filtració és un procés simple, les complicacions apareixen a causa de la gran quantitat de partícules i residus presents a la mostra, que obstrueixen ràpidament els filtres i conseqüentment es perd efectivitat. Per al que per solucionar el tema de l'obstrucció, s'utilitzen mesures com realitzar una filtració prèvia amb una mida de porus superior a la desitjada o bé, addicionar substàncies químiques que facin flocular la fracció sòlida de la mostra (Wang & Wang, 2018).

Per reduir les pèrdues de mostra a causa de adherències a la paret del recipient, es recomana esbandir les parets amb aigua purificada i posteriorment, fer-ho passar per al mateix filtre. Aquest procés però, cal realitzar-lo amb molta cura per evitar que la pressió redueixi la mida dels fragments.

Per a poder reutilitzar els filtres, aquells que ho permeten, és recomana esbandir-los amb aigua pura o ultrapura per evitar la formació de cristalls, abans d'emmagatzemar-los.

### 3.2.2.2.3 Cribratge

La utilització de sedassos juntament amb la de filtres, permet separar els microplàstics segons la seva mida. La mostra s'aboca sobre el sedàs i posteriorment s'esbandeixen amb aigua ultra purificada per tal de recol·lectar totes les partícules. Aquesta tècnica es pot realitzar directament a la zona de mostreig o be al laboratori, fet que els fa molt recomanables per a mostres de rius i llacs, ja que permeten filtrar grans quantitats d'aigua i separar les partícules sòlides en el mateix moment del mostreig, reduint considerablement el volum de mostra (Meng et al., 2020).

El nombre de sedassos utilitzats, depèn de l'objectiu d'estudi, doncs aquests permeten categoritzar i classificar els microplàstics segons la mida (Cutroneo et al., 2020). També es poden utilitzar de forma complementària amb la utilització de filtres. Permet separar fragments de diferents mides o si més no, separar aquells fragments més grans, per a posteriorment filtrar les partícules no retingudes en el sedàs.

La mida dels sedassos escollida determina la mida de partícules que seran retingudes i per tant, analitzades. Les mides de porus utilitzades varien entre 20-300µm, essent la mida més comú 50µm.

Generalment, s'utilitzen sedassos d'acer inoxidable (*Figura 2*) o fibra de vidre en comptes d'eines de plàstic, amb l'objectiu de minimitzar la contaminació durant el procés de cribratge.



Figura 2: Sedàs d'acer inoxidable 50µm.

Com a desavantatge d'aquesta tècnica, inclou la possible obstrucció dels sedassos i la inversió de temps que requereix realitzar el cribratge de totes les mostres.

### 3.2.3 Identificació de microplàstics

Els microplàstics són presents a l'ambient amb una gran varietat de mides, formes i colors. Les seves característiques determinen com estaran distribuïts a l'ambient i l'impacte que tindran. Els microplàstics acostumen a degradar-se amb el pas del temps en fragments cada cop més petits a causa de la meteorització, la radiació UV i la hidròlisi.

#### 3.2.3.1 Caracterització dels microplàstics

El nombre de categories utilitzades per a classificar els microplàstics, depèn del criteri de cada autor i pot variar lleugerament. Comunament, els paràmetres més rellevants són la mida, la

morfologia i el color, tot i que en alguns estudis, es fa també referència a l'origen i el grau de degradació, paràmetres més difícils de determinar.

#### ❖ Mida

La mida de plàstics recol·lectats depèn dels mètodes de mostreig i tractament de les mostres utilitzat. Diferents mides de microplàstics s'han analitzat en els diferents estudis, generalment són considerats microplàstics, aquelles partícules inferiors a 5mm. Però a la vegada, no existeix una mida mínima estipulada per definir-los. El microplàstic més petit reportat és d'1µm de diàmetre i 20µm de longitud (Hidalgo-Ruz et al., 2012).

Els microplàstics tenen mides similars a moltes espècies bentòniques i planctòniques, fet que els dona gran potencial per ser ingerits per una gran varietat d'organismes. A més, aquest fet fa comportar que la recollida de mostres contempla la recollida de grans quantitats d'aquestes espècies, sobretots en èpoques de creixement, pel que caldrà donar gran importància en l'eliminació de matèria orgànica de les mostres.

#### ❖ Morfologia

Tal i com mostra la *Figura 3*, les formes observades habitualment són, fibres, grànuls, lamines i fragments, essent les fibres les més predominants (Fok et al., 2019).

La forma dels microplàstics pot indicar quin és el seu origen potencial. Per exemple, les fibres majoritàriament provenen del desgast de la roba sintètica durant el seu rentat, les làmines de la desintegració de les bosses de plàstic i fragments d'ampolles de plàstic.

Les propietats dels plàstics varien al llarg del temps, els grànuls redueixen significativament la seva densitat específica a causa de la resistència de l'aigua. La forma depèn bàsicament del procés de fragmentació així com el temps de residència en el medi ambient. Les formes punxegudes, s'associen amb una recent introducció a l'ecosistema, mentre que les formes més llises s'associen a fragments més antics que han patit erosió a causa del fregament amb altres partícules i sediments (Hidalgo-Ruz et al., 2012), però per al moment no existeixen mètodes que permetin determinar els temps que les partícules han estat en un determinat ecosistema. Les partícules més grans, habitualment presenten formes més allargades i superfícies més irregulars, mentre que, a mesura que van reduint la mida, adopten formes més circulars.

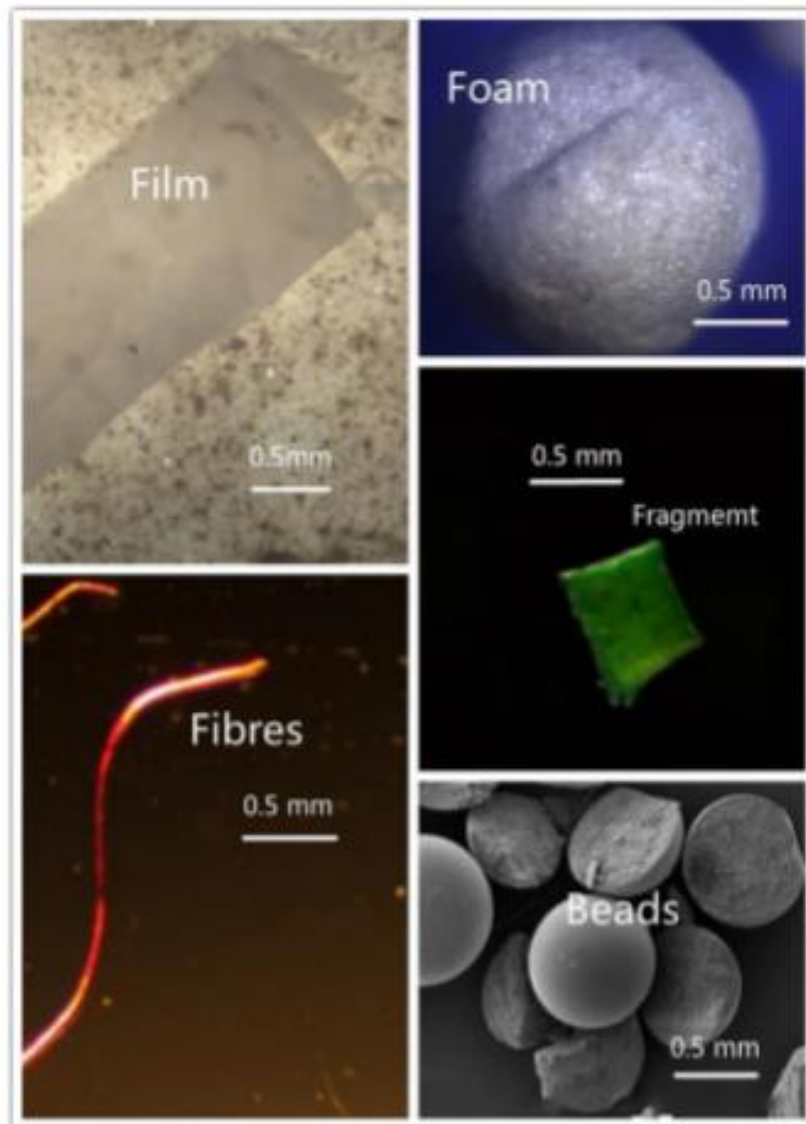


Figura 3: Morfologies dels microplàstics (C. Li et al., 2020).

#### ❖ Color

Els microplàstics presenten un ampla variació de colors. Els més habituals, són blancs o similars, colors groguencs i crema, però també poden ser transparents, cristal·lins, vermells, taronges, blaus, opacs, negres, grisos, marrons, verds i grogs.

El color dels plàstics facilita la separació especialment quan es troben dispersos entre grans quantitats d'altres residus, facilitant la identificació visual.

El polipropilè (PP) acostuma a ser descrit com a grànuls clars i transparents, mentre que el polietilè (PE) presenta grànuls de color blanc (Hidalgo-Ruz et al., 2012). El PE de baixa densitat acostuma a tenir colors opacs, mentre que el etil vinil acetat, pel·lets gairebé transparents i clars. Així doncs, el color també proporciona informació rellevant per conèixer la seva font o origen (Fok et al., 2019).

A més a més, el color es un indicador de la fotodegradació, del temps de residència en el medi ambient i de la meteorització que ha patit el microplàstic. Habitualment l'engrogiment dels polímers i la pèrdua de color indiquen llargs temps d'exposició en un determinat ecosistema, pel que proporciona una mesura qualitativa de l'edat dels microplàstics (Guo & Wang, 2019).

Per estandarditzar el criteri de selecció de partícules plàstiques, la inspecció ha de ser molt estricta per evitar identificar de forma errònia. La Guia d'identificació de microplàstics, publicada per MERI "Marine & Environmental Research Institute" (2017) basada en les observacions de Hidalgo-Ruz et al. (2012), proposa el següent criteri:

- (i) Les partícules sospitoses no han de tenir estructures cel·lulars ni teixits orgànics visibles, tot i que material orgànic s'hi pot trobar adherit a la superfície del plàstic
- (ii) Les partícules no s'han de trencar quan s'estiren,
- (iii) Les partícules no brillen ni rellueixen,
- (iv) Tenen un color homogeni tot hi que hi ha algunes excepcions en plàstics que presenten patrons o línies. A més, adhesions de matèria orgànica poden dissimular o bé descolorir les fibres.
- (v) Les fibres no tenen ramificacions i tenen un gruix uniforme al llarg de tota la seva longitud.

### 3.2.3.2 Tècniques visuals

La inspecció visual permet classificar les partícules plàstiques en base les seves característiques físiques. Si les partícules més grosses són l'objectiu d'estudi (>500µm), la visualització pot ser directa, a ull nu, mentre que les partícules més petites acostumen a requerir la utilització d'un microscopi, tot i que Hidalgo-Ruz et al. (2012) suggereix posar el límit a 1mm per a la identificació visual sense microscopi. A la *Taula 2*, es mostra el resum de les tècniques d'identificació visual i la mida dels microplàstics capaces de detectar.

Taula 2: Tècniques d'identificació visual: límit de detecció i particularitats.

<b>Tècnica visual</b>	<b>Límit de detecció</b>	<b>Particularitats</b>
<b>'The Hot Needle Test'</b>	>500µm	Diferencia entre els fragments plàstics i la matèria orgànica.
<b>Microscòpia òptica</b>	>0.2 µm	Dificultat per visualitzar les partícules blanques i transparents.
<b>SEM</b>	>2 nm	Caracteritza la superfície dels microplàstics.

#### 3.2.3.2.1 "The Hot Needle Test"

'The Hot Needle Test' (basat en Witte et al., 2014) es una tècnica que permet diferenciar partícules plàstiques de la matèria orgànica, per el que es una prova molt útil quan no s'està segur de l'origen de les partícules de la mostra.



S'utilitza una agulla ben calenta, que en contacte amb les partícules plàstiques provoca que aquestes es fonguin o bé es cargolin, mentre que la matèria orgànica i altres fragments d'origen biològics no ho faran. És molt important que l'agulla estigui ben calenta, ja que sinó, no es veurà cap moviment encara que la partícula sigui d'origen plàstic (MERI "Marine & Environmental Research Institute" 2017).

Aquesta prova funciona bé quan els fragments estan dispersos en la mostra, ja que si els fragments es disposen molt junts dificulta la realització de la tècnica. A més, els fragments identificats s'han de poder observar a simple vista, superior a 500µm.

Si tot aplicant aquesta tècnica no s'està segur, es recomana observar el fragment en qüestió sota el microscopi.

#### 3.2.3.2.2 Tècniques de microscòpia

La microscòpia una de les tècniques més extensament utilitzat per a la identificació de microplàstics ja que es tracta d'un mètode econòmic i relativament ràpid. Guies per a la identificació de microplàstics, com la publicada per MERI "Marine & Environmental Research Institute" al 2017, faciliten l'estandardització i per tant la comparació entre diferents estudis. Tot i això, és un mètode habitualment utilitzat com a mètode de preselecció abans d'aplicar altres mètodes que confirmen la naturalesa química de les partícules, com per exemple l'espectroscòpia FTIR (Prata et al., 2019).

La utilització de microscopis òptics, tant compostos com de dissecció, permet identificar els microplàstics, estructures cel·lulars i bio-adherències presents a les mostres. Els microscopis de fluorescència, acostumen a utilitzar-se per analitzar partícules blanques i transparents, ja que tenen més resolució.

La principal limitació de la identificació visual és la subjectivitat, perquè les habilitats del personal hi estan molt relacionades. Hi ha moltes probabilitats d'error i per això requereixen tècniques complementàries per validar els resultats.

Els investigadors tracten de millorar aquestes tècniques visuals utilitzant diferents tipus de microscopis, utilitzant tincions i altres tècniques aplicades quan no s'està segur de l'origen plàstic de les partícules.

##### 3.2.3.2.1.1 Tincions

La utilització de tincions és un mètode econòmic que facilita la identificació visual. Alguns dels colorants utilitzats per a tenyir els microplàstics són: Oil red EGN, Eosin B, Hostasol Yellow 3G i Rose Bengal. L'eficàcia d'aquests però varia en funció del tipus de polímer i per la presència de bio-adherències present a la superfície dels microplàstics, pel que requereix un procés de digestió previ (Prata et al., 2019).

El colorant Nile Red presenta un seguit d'avantatges en comparació els anteriors, els temps d'incubació són més curts i el percentatge de recuperació més elevat. La matèria orgànica no es tenyeix i no es veu afectat per el grau de degradació. Es tracta d'una tinció fluorescent, per el que requereix un microscopi de fluorescència per a ser visualitzat. Hi ha partícules però, que

presenten senyals lleus, com per exemple les fibres, les quals habitualment tenen dificultats per ser tenyides (Prata et al., 2019).

#### 3.2.3.2.1.2 Microscòpia electrònica de rastreig (en anglès SEM)

El Microscopi electrònic de rastreig proporciona imatges d'alta resolució gràcies al bombardeig d'electrons d'alta intensitat. Permet identificar la morfologia dels microplàstics i d'altres impureses presents. També permet analitzar el procés de meteorització examinant les característiques superficials, com la textura de les partícules (Wang & Wang, 2018).

SEM proporciona imatges d'alta resolució que es poden combinar amb altres instruments com l'espectroscòpia d'energia dispersiva, SEM-EDS (en anglès Scanning Electron Microscopy – Energy Dispersive Microscopy) o amb combinació amb l'espectroscòpia de rajos-X, SEM-XEDS (en anglès Scanning Electron Microscopy – Energy Dispersive X-Ray Spectroscopy). Proporciona informació sobre la mesura de difracció i refracció de la radiació emesa per la superfície de les partícules, determinant la composició elemental i la morfologia dels microplàstics i d'altres substàncies inorgàniques que hi puguin haver (Rios Mendoza & Balcer, 2019).

SEM es tracta d'una tècnica amb un gran potencial, que permet visualitzar la morfologia dels microplàstics de forma més clara i precisa. A la *Figura 4*, es mostren algunes imatges de les formes més comuns que presenten els microplàstics.

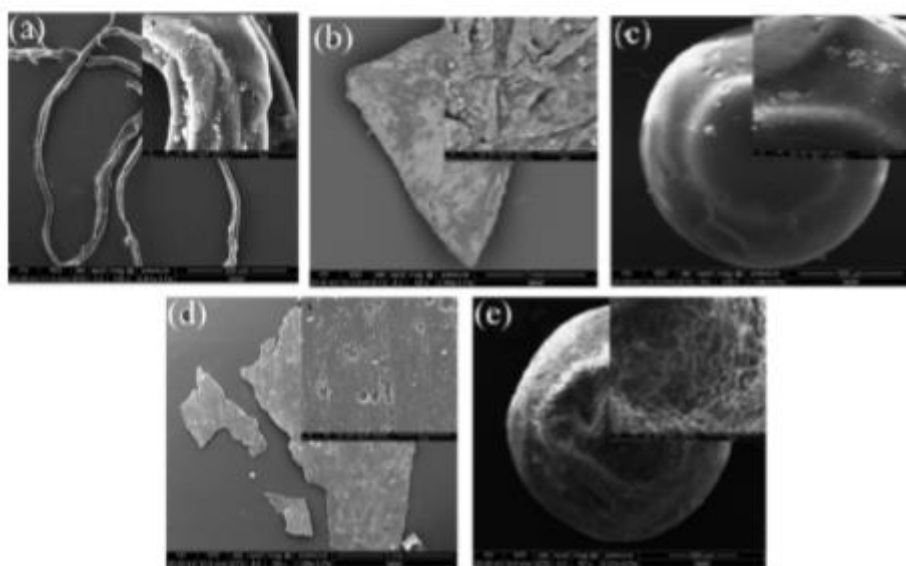


Figura 4: Imatges de diferents morfologies de microplàstics obtingudes amb SEM. A). fibra, B). fragment, C). grànul, D). làmina i E) escuma.

Com a limitacions del mètode cal destacar l'elevat cost d'adquisició dels equips i la complexa preparació de les mostres, fet que no la fa una tècnica aplicable per analitzar grans numero de mostres. A més, el nombre d'errors augmenta a mesura que disminueix la mida de les partícules, tot i això, és de gran ajuda per a realitzar una identificació prèvia de microplàstics. (Bretas Alvim et al., 2020).

### 3.2.3.3 Tècniques d'espectroscòpia

Les tècniques d'espectroscòpia proporcionen informació de l'estructura química dels microplàstics. Es tracta de tècniques no destructives capaces d'identificar els tipus de microplàstics presents a les mostres. A la *Taula 3*, es mostra el resum de les tècniques d'espectroscòpia disponibles i la mida dels microplàstics capaces de detectar.

Taula 3: Tècniques d'espectroscòpia: límit de detecció i particularitats.

<b>Tècnica espectroscòpia</b>	<b>Límit de detecció</b>	<b>Particularitats</b>
<b>IR</b>	<180 $\mu\text{m}$	Informació de l'estructura química dels microplàstics.
<b>FTIR</b>	>20 $\mu\text{m}$	Proporciona informació del grau de meteorització dels microplàstics.
Micro-FTIR	<20 $\mu\text{m}$	Capacitat de quantificar.
ATR-FTIR	>500 $\mu\text{m}$	Detecció de partícules irregulars, gruixudes i opaques.
<b>Raman</b>	>1 $\mu\text{m}$	Dificultat per detectar mostres fluorescents.

#### 3.2.3.3.1 Espectroscòpia d'infrarojos i transformació de Fourier

La identificació basada en l'espectroscòpia de rajos infrarojos (IR) permet identificar els microplàstics en base la seva estructura química (Pinto da Costa et al., 2019).

Aquesta tècnica consisteix a irradiar la mostra amb llum infraroja. Una part d'aquesta radiació és absorbida per les partícules en funció de l'estructura molecular, la qual pot ser mesurada per transmissió o bé per refracció. Cada material presenta diferents enllaços químics que el caracteritzen, pel que l'espectroscòpia genera espectres específics de cada polímer basats en el moment dipolar, els quals es poden avaluar manualment o bé comparar-los amb una llibreria d'espectres de referència (Bretas Alvim et al., 2020).

La transformació de Fourier, FTIR (en anglès Fourier-transform Infrared Spectroscopy), va incrementar el grau de resolució en comparació l'espectroscòpia IR convencional, a més, a causa de la formació de grups carbonils associats a l'oxidació, proporciona informació addicional sobre grau de meteorització dels plàstics (Pinto da Costa et al., 2019). FTIR es capaç d'identificar químicament partícules encara mes petites, amb un límit de resolució de 20 $\mu\text{m}$  (Wang & Wang, 2018).

És utilitzada amb dues finalitats bàsiques, estudiar les partícules sospitoses o bé validar els resultats de la identificació visual. Tot i que proporciona una informació més fiable, també té algunes limitacions, així com el cost i el temps dedicat.

L'optimització de la tècnica com la microespectroscòpia (micro-FTIR), reflectància total atenuada (ATR-FTIR) o en matrius en plànols focals (FPA-FTIR) ha estès la utilització de la tècnica de forma universal. La tècnica Micro-FTIR produeix un mapa d'alta resolució i facilita la detecció

de partícules inferiors a 20 $\mu\text{m}$ , però per contra es molt sensible a pigments i contaminants (Rios Mendoza & Balcer, 2019) i no és aplicable per a partícules amb formes irregulars (J. Li et al., 2018). ATR-FTIR millora la informació de partícules irregulars i a diferència a FTIR també és aplicable a mostres gruixudes i/o opaques. És eficient per a partícules >500 $\mu\text{m}$ , però per contra, no permet visualitzar tota la superfície, pel que FPA, permet visualitzar l'àrea complerta, és una tecnologia d'alt rendiment per l'anàlisi de partícules superior 20 $\mu\text{m}$ . Segons Wang & Wang, (2018), FPA-FTIR permet caracteritzar químicament i físicament totes les partícules de la mostra simultàniament. En comparació a FTIR convencional, la detecció és molt més ràpida, però els instruments tenen un cost més elevat i requereix un elevat poder de processament.

#### 3.2.3.3.2 Espectroscòpia de Raman

L'espectroscòpia de Raman permet identificar els microplàstics segons la seva composició química, però només permet analitzar una petita quantitat de la mostra (Anger et al., 2018).

La tècnica consisteix a irradiar les mostres amb un làser monocromàtic que proporcionarà informació de l'estructura molecular i la composició atòmica del microplàstic (Wang & Wang, 2018). La interacció del làser amb les molècules i àtoms de la mostra, dona lloc a diferències en la freqüència de llum irradiada. Aquest canvi és detectable, pel que s'obtenen espectres específics de cada substància (Bergmann et al., 2015). Els espectres permeten identificar els microplàstics en pocs minuts mitjançant la comparació amb els espectres de referència.

Com totes les tècniques d'espectroscòpia, Raman és una tècnica no destructiva pel que proporciona grans avantatges en cas de requerir anàlisis posteriors de la mostra (Fok et al., 2019).

En comparació amb FTIR, Raman disposa de més resolució i un rang més ampli d'identificació, detectant partícules més petites, entre 1 $\mu\text{m}$  i 5mm. A més, és menys sensible a les interferències causades per l'aigua, doncs les mostres no han d'estar completament seques a diferència de l'espectroscòpia IR i FTIR.

De la mateixa manera que FTIR, identifiquen els microplàstics mitjançant la petjada vibracional de les partícules, la diferència és que els espectres FTIR es basen en el moment dipolar de l'enllaç químic, mentre que els espectres de Raman depenen del canvi de polaritat dels enllaços (Bretas Alvim et al., 2020).

Habitualment també es coneguda com a microscòpia de Raman (RM), ja que s'acostuma a combinar amb tècniques de microscòpia per augmentar la resolució, permet identificar químicament i morfològicament els microplàstics encara que sigui en un percentatge molt petit del volum total de mostra (Anger et al., 2018). Permet detectar partícules inferiors a 1 $\mu\text{m}$  (Wang & Wang, 2018).

El principal inconvenient de la tècnica són les interferències causades per additius, pigments i químics adherits que afecten negativament alhora de realitzar una identificació acurada. Les mostres tenyides amb colorats fluorescents proporcionen espectres impossibles d'interpretar pel que s'haurien d'utilitzar làsers menys potents que conseqüentment disminuirien la senyal dels polímers. Bergmann et al. (2015) considera necessari purificar les mostres per a realitzar una identificació eficaç.

Araujo et al. (2018), en base la comparació entre les tècniques FTIR i Raman realitzades per Kaeppler et al. (2016), va il·lustrar un rendiment superior de la tècnica d'espectroscòpia de Raman, per a detectar les partícules més petites, però en partícules superiors a 20µm, el rendiment va ser el mateix en ambdues tècniques. La tècnica Raman va detectar microplàstics de 5µm, mentre que en l'espectre FTIR gairebé no hi figuren partícules inferiors a 20µm, per tant el límit de difracció dels instruments influeix a la qualitat dels espectres per culpa del soroll de fons. Aquest problema és il·lustrat a la *Figura 5*, on es comparen els espectres Raman i IR del polipropilè (PP). L'espectre de Raman és més similar al de referència i la imatge és més clara i precisa, mentre que en la imatge de IR, hi ha soroll de fons que infereix en la qualitat.

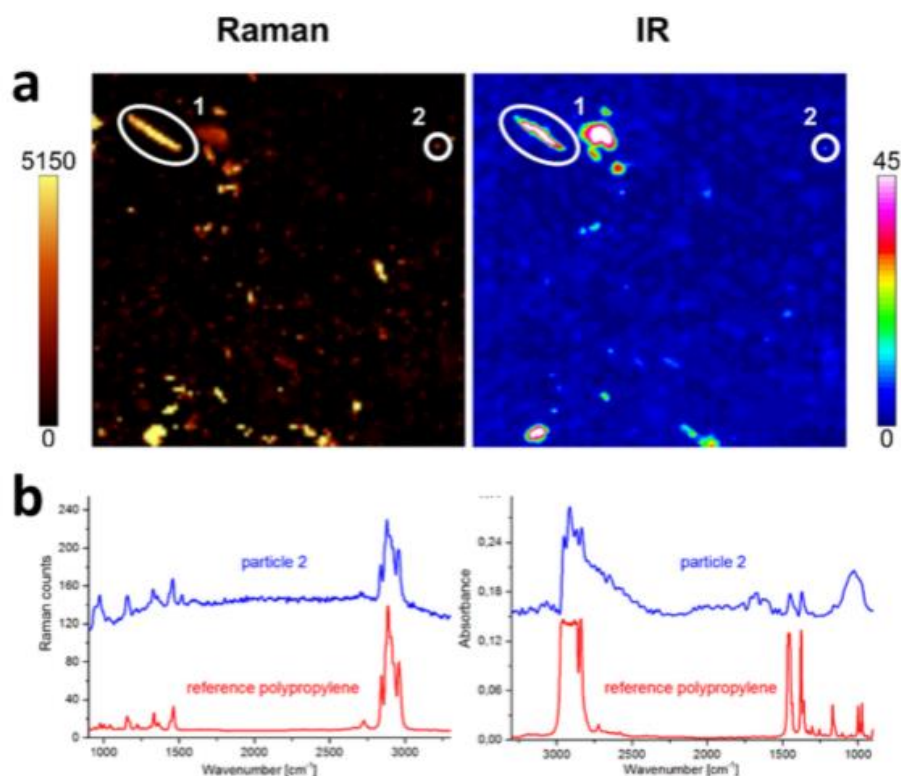


Figura 5: A). Comparació d'imatges de Raman i IR. B). Espectres de Raman i IR en comparació l'espectre de referència del polipropilè (PP) (Araujo et al., 2018).

La tecnologia Raman té un gran potencial, però requereix millores per tal de suplir els dèficits de la tècnica. Actualment els esforços estan centrats a optimitzar la qualitat del senyal i en automatitzar el procés de manera que permetés una identificació de microplàstics més ràpida i real (Araujo et al., 2018). Però no és de menor importància la diferència de preus, el làser Raman és molt més car en comparació a l'equip FTIR, 250.000,- USD versus 50.000,- USD (Mai et al., 2018).

#### 3.2.3.4 Degradacions termals

Un altre opció per a la caracterització de microplàstics és la utilització de tècniques termo-analítiques. El desenvolupament d'aquestes tècniques és clau, sobretot per a la caracterització de microplàstics poc solubles i amb presència d'additius.

Aquests tipus d'anàlisi permeten analitzar mostres sòlides un cop han patit una separació física, com per exemple l'ús de tècniques cromatogràfiques, tot i que requereixen la destrucció de les estructures dels polímers. La *Taula 4* mostra el resum de les tècniques tèrmiques disponibles per a la identificació de microplàstics i la mida dels microplàstics capaces de detectar.

Taula 4: Degradacions termals: límit de detecció i particularitats.

<b>Tècnica espectroscòpia</b>	<b>Límit de detecció</b>	<b>Particularitats</b>
<b>Py-GC/MS</b>	<100 µm	Fragmentació de la mostra. Quantificació de la massa dels fragments.
<b>TED-GC/MS</b>	<100 µm	Permet analitzar més quantitat de mostra. Quantificació de la massa dels fragments.
<b>TGA-DSC</b>	200-500 µm	Anàlisi de les propietats termodinàmiques dels microplàstics.

#### 3.2.3.4.1 Piròlisi - Cromatografia Gas - Espectrometria de masses (Py-GC/MS)

L'acoblament de la piròlisi a la cromatografia de gasos es basa en degradar la mostra i separar els fragments dels polímers en una columna cromatogràfica amb la finalitat de caracteritzar els microplàstics, pel que es tracta d'una tècnica destructiva. Permet descriure els components químics obtinguts després de la piròlisi ja que cada polímer conté ions que serveixen d'indicadors per a identificar diferents tipus de microplàstics i quantificar-ne la massa (Peñalver et al., 2020).

Py-GC-MS té la capacitat de simultàniament proporcionar informació de la composició química del polímer i dels possibles components orgànics presents, a més no requereix un tractament exhaustiu de la mostra (Wang & Wang, 2018). Però per contra, no és una tècnica sensible a la mida i la forma, ja que les partícules són desintegrades abans de l'anàlisi. Requereix petites quantitats de mostra (100-500µg) per a l'anàlisi, indicant l'aplicació per a l'anàlisi de traces i adient per a l'anàlisi de mostres homogènies. És un inconvenient quan les mostres són heterogènies, ja que els resultats no seran representatius de tota la mostra.

En base al fet de que la tècnica requereix la introducció manual de les partícules dins el tub de piròlisi, únicament les partícules superiors a 100µm poden ser manipulades, fet que limita la mida de l'anàlisi de microplàstics (Wang & Wang, 2018). A més, la tècnica únicament permet l'anàlisi d'una partícula per anàlisi, fet que no el fa adequat per al processament de grans quantitats de mostres (Bergmann et al., 2015).

La identificació es realitza comparant els pirogrames obtinguts amb els pirogrames de referència (Peñalver et al., 2020).

Peñalver et al., (2020) en base la comparació realitzada per Kaeppler et al., entre py-GC-MS i µ-ATR-FTIR, va identificar microplàstics en mostres amb presència additius orgànics amb py-GC-MS però no amb µ-ATR-FTIR. Per contra, Py-GC-MS no va ser capaç d'identificar fibres

sintètiques a causa de presentar una massa insuficient, però si va ser capaç de detectar copolímers. També va determinar, que l'anàlisi amb  $\mu$ -ATR-FTIR es més curt, 1 min vrs 30 min, a més és tracta d'una tècnica no destructiva.

Per suplir els dèficits de la tècnica, s'han utilitzat variants de Py-GC-MS com l'extracció-desorció termal combinada a la cromatografia de gasos i a l'espectròmetre de masses (TED-GC/MS).

#### 3.2.3.4.2 Extracció-desorció termal automatitzada i Escaneig calorimètric diferencial

L'extracció-desorció termal automatitzada, TED-GC/MS, combina l'extracció termal amb la termogravimetria (TGA) i la desorció termal acoblada a la cromatografia de gasos i a l'espectròmetre de masses (TDS-GC/MS), fent possible l'anàlisi de microplàstics.

La termogravimetria degrada les mostres per l'acció d'un procés tèrmic sota una atmosfera controlada. Proporciona informació de la pèrdua de massa i permet identificar els productes de degradació obtinguts en el procés (Peñalver et al., 2020).

En comparació amb altres tècniques tèrmiques, la termogravimetria té límits de detecció més alt, normalment es tracta d'una tècnica més econòmica i la preparació de la mostra és mínima. TED-GS/MS permet analitzar quantitats més grans de mostra (unes 200 vegades en comparació a Py-GC/MS) i és capaç de realitzar l'anàlisi de manera més ràpida (Pinto da Costa et al., 2019).

Una de les limitacions de TGA-MS és la complexitat de la interpretació de les dades, sobretot quan la mostra conte impureses o bé partícules amb masses i/o temperatures de degradació similars, ja que els gasos analitzats no se separen abans d'entrar al detector del MS. Fet que suggereix incloure una columna cromatogràfica per a realitzar una separació prèvia a l'anàlisi a l'espectròmetre de masses (Peñalver et al., 2020).

La termogravimetria acoblada l'escaneig calorimètric diferencial, TGA-DSC, també és un mètode adequat per a la caracterització de microplàstics. DSC és utilitzat per determinar les propietats termodinàmiques i les temperatures dels estats de transició. Quan la mostra pateix un procés endotèrmic o exotèrmic, el canvi de temperatura resulta en un pic observat en el sistema DSC, on les àrees dels pics poden ser utilitzades amb fins de quantificació (Peñalver et al., 2020). La presència d'impureses i additius a la mostra i la mida de les partícules afecten a la temperatura de transició observada en el DSC, pel que cal que les mostres siguin prèviament filtrades per assegurar una mida de partícules d'entre 200-500 $\mu$ m.

En comparació als mètodes espectroscòpics, el major desavantatge de les tècniques termoanalítiques és el fet de que són destructives. Només proporciona informació de les característiques químiques dels microplàstics, limitat en la caracterització morfològica d'aquests (Wang & Wang, 2018). Es tracta d'una bona metodologia per a identificar microplàstics, la forma d'operar es directa, senzilla i és rentable, però alguns autors recomanen completar l'anàlisi amb tècniques de microscòpia, amb el fi de caracteritzar morfològicament els microplàstics i/o amb tècniques l'espectroscòpia, amb l'objectiu de validar els resultats.

#### 3.2.3.5 Altres

Diferents polímers presenten diferent composició elemental, pel que la utilització d'analitzadors C:H:N permet la identificació de microplàstics. Segons els autors, cal una prèvia separació de les

partícules recol·lectades, segons la seva densitat. No es una tècnica gaire rigorosa i requereix molt temps, pel que no és recomanable per a l'anàlisi de gran quantitat de partícules. Tampoc no es aplicable per a partícules molt petites (Pinto da Costa et al., 2019) (Bergmann et al., 2015).

Recentment ha estat suggerida la identificació i caracterització de suspensions amb polímers, amb imatges híper-espectrals. S'utilitzen un sensors que recopilen i processen la informació de tot l'espectre electromagnètic, proporcionant imatges que permeten identificar i quantificar els microplàstics.

Aquest mètode, ja ha estat validat, tant com per a mostres de referència com a mostres reals. Reconeix en un 100% les partícules inferiors a 300µm, demostrant ser un mètode no destructiu ni invasiu, econòmic, ràpid i fiable, que a més no requereix gaire preparació prèvia de les mostres. La tècnica ha permès identificar partícules de PE d'entre 1-5mm amb una precisió del 84% i amb un 77% les partícules d'entre 0.5-1mm (Pinto da Costa et al., 2019). Com a avantatge, permet analitzar de forma directa mostres obtingudes amb xarxes d'arrossegament, mostres íntegres d'aigua i mostres superficials de sediments, però per el moment únicament ha estat testat per a la caracterització de PE, PP i PS. Es una tècnica amb un gran potencial que requereix de futures investigacions per a millorar el rang d'identificació.

#### 3.2.4 Quantificació de microplàstics

La quantificació de microplàstics és necessària per a determinar l'abundància en els diferents ambients. Tradicionalment, les partícules són comptades manualment amb el suport d'un microscopi (Mai et al., 2018), en el que la quantitat passa a concentració. Però el recompte manual de microplàstics és un treball laboriós que requereix temps.

Depenent de la mida, els microplàstics poden ser col·lectats amb unes pinces i pesats per a determinar-ne la massa. En els últims anys, les tècniques quantitatives acostumen a anar acompanyades de tècniques qualitatives per a obtenir resultats més precisos. Py-GC/MS, per exemple, permet distingir partícules i quantificar partícules del mateix tipus, però la petita quantitat de mostra analitzada és molt poc representativa de tot el conjunt i únicament s'acostuma a utilitzar per a determinar la identitat, mitjançant la massa dels polímers (Mai et al., 2018).

A més de la cromatografia de gasos, la cromatografia líquida permet quantificar mostres de microplàstics amb la utilització dels solvents adequats per dissoldre els diferents polímers. Alguns dels solvents utilitzats són tetrahidrofurà i hexafluoroisopropanol, utilitzat per a la dissolució de PS i PET. Un cop preparades les solucions i els polímers, les mostres són analitzades per HPLC (High Performance Liquid Chromatography) amb sistemes d'exclusió, de manera que proporciona informació sobre la mida dels polímers i a la vegada, permet quantificar-los. De totes maneres, aquest mètode no ha estat aplicat en mostres ambientals reals, per al que es necessiten nous estudis per verificar la utilitat del mètode per a la quantificació de microplàstics (J. Li et al., 2018).

Tincions com la de Nile Red també han estat utilitzades per als investigadors per a quantificar microplàstics. Les partícules són visualitzades clarament sota el microscopi de fluorescència, fet que permet fàcilment realitzar-ne el recompte (J. Li et al., 2018).



L'espectrofluorímetre es un equip utilitzat recentment per a la quantificació de microplàstics. Es tracta d'una tècnica similar a l'espectrofotometria UV-Vis, on els valors de fluorescència són correlatius a la concentració de partícules en suspensió. Son necessàries un seguit suspensions estàndard de referència independents, per a comparar amb les solucions mostra. Però es tracte d'un mètode molt sensible a factors com el pH o a la presència d'oxigen dissolt, fet que podria afectar a l'hora de reproduir el mètode (Pinto da Costa et al., 2019).

Altres autors, remarquen el potencial de l'escaneig calorimètric diferencial (DSC) combinat amb la microscòpia òptica per a la identificació i quantificació de microplàstics. És capaç de determinar la mida dels polímers segons la temperatura característica que adquireixen i quantificar-los segons el flux de calor, tal i com explicat anteriorment. La major limitació de la tècnica però és la necessitat de realitzar un pre-tractament per a purificar les mostres (Peñalver et al., 2020).

Les unitats de concentració que es fan servir habitualment per a determinar l'abundància de microplàstics en aigües superficials en mostres obtingudes per reducció de volum s'expressen en termes de volum de mostra, 'partícules per m<sup>2</sup>' o be 'partícules per m<sup>3</sup>'. Mentre que mostres íntegres, son quantificades amb termes de superfície mostrejada, 'partícules per m<sup>3</sup>'. Els sediments, en 'partícules per m<sup>2</sup>', 'grams/mg per m<sup>2</sup>', 'partícules per kilogram en pes sec' i 'partícules per m<sup>2</sup> d'aigua mostrejada'. El principal inconvenient de les unitats d'expressió es la possibilitat d'utilitzar unitats de superfície i unitats de volum, per reportar l'abundància de microplàstics (Mai et al., 2018).

### 3.2.5 Contaminació de les mostres

La presència de fibres a l'ambient és recurrent en molts dels estudis publicats, per el cal prendre un seguit de precaucions per evitar la contaminació de les mostres i la sobreestimació els resultats.

#### 3.2.5.1 Durant el mostreig

En la majoria de publicacions revisades es destaca la necessitat de realitzar controls de contaminació durant el procés de recollida de mostres, ja que l'equipament pot contaminar-se i interferir en els resultats. Caldrà tenir un seguit de precaucions, així com guardar les malles en bosses de cotó per tal d'evitar el contacte amb fibres sintètiques, evitar dur roba d'origen sintètic el dia del mostreig i preferiblement, evitar la utilització de material plàstic durant el mostreig.

Els controls de contaminació es realitzen abans d'iniciar el mostreig, fent passar aigua purificada per les malles. Aquesta mostra serà tractada i analitzada de la mateixa manera que la resta, de manera que serà possible detectar la presència de contaminacions anteriors al mostreig i per tant, proporcionar resultats reals de la quantitat de microplàstics presents a la mostra.

#### 3.2.5.2 Durant el tractament de les mostres

Un cop al laboratori, cal realitzar un treball meticulós per evitar la contaminació de les mostres, principalment per partícules presents. Per això, és absolutament necessari treballar sota la cabina d'extracció de fums. La roba i bates del personal de laboratori, han d'estar netes i

preferentment han de ser lliures de materials sintètics. Cal tenir especial precaució en la neteja dels materials a utilitzar, així com evitar la utilització de materials plàstics.

Durant el processament de les mostres calen controls de contaminació, sobretot ambientals, per poder detectar partícules que puguin sobreestimar els resultats de la mostra (Stock et al., 2019).

La Guia d'identificació de microplàstics, MERI "Marine & Environmental Research Institute," publicada al 2017, va proposar un seguit de precaucions per reduir la contaminació de fibres ambientals. Aquestes fan especial èmfasi en la protecció i cobriment de les mostres i filtres durant el seu manipulats. Els filtres han de romandre emmagatzemats en plaques de petri, aquestes preferiblement de vidre. Netejar totes les superfícies abans d'inspeccionar les mostres així com, minimitzar el flux de tècnics en el laboratori abans i durant el manipulats de les mostres.

### 3.3 Discussió de resultats

A continuació es discuteix l'elecció dels mètodes que podrien ser utilitzats per el processament de les mostres i per a l'anàlisi de microplàstics, tenint present el cost i la disponibilitat de recursos.

Un cop obtingudes les mostres, cal digerir la matèria orgànica al més aviat possible per evitar el seu deteriorament. Existeixen diferents possibilitats per a digerir les mostres, però tenint present l'eficàcia i el baix cost del peròxid d'hidrogen ( $H_2O_2$ ), el fa l'opció més adient. Les mostres digerides, es poden emmagatzemar per a analitzar-les en un futur pròxim.

Existeix tot un ventall de possibles tractaments previs per separar els microplàstics de la seva matriu i purificar les mostres abans d'analitzar-les, sempre que siguin compatibles amb les tècniques que s'aplicaran posteriorment. La filtració i el cribratge són adients si la finalitat és classificar els microplàstics segons la mida o bé acotar l'estudi en un rang de mida determinat, però en tractar-se de mostres obtingudes per reducció de volum, no solen ser indispensables ja que les malles d'arrossegament utilitzades ja determinen la mida de partícules recol·lectades. Una prèvia separació visual, permet eliminar materials que a simple vista podem confirmar que no són partícules plàstiques, així com closques, algues i altres contaminants. La separació per densitat però, tot i que també s'ha utilitzat per a mostres d'aigua, és més adequada per a la separació de microplàstics en mostres de sediments.

A la *Taula 5*, es resumeixen els principals mètodes disponibles per a identificar i quantificar microplàstics, així com els avantatges i els inconvenients de les tècniques. La identificació visual se centra a caracteritzar els microplàstics amb l'ajuda de microscopis òptics i permet classificar-los segons la mida, la forma i el color. És un mètode fàcil i relativament econòmic però la seva principal limitació és l'elevada probabilitat d'error, ja que depèn de la destresa del tècnic que realitza l'anàlisi. La utilització de tincions com la de Nile Red faciliten la identificació d'aquells fragments transparents, però aquesta tècnica requereix un microscopi de fluorescència per visualitzar els fragments tenyits. Quan no s'està segur de la composició plàstica de les partícules, una forma ràpida, senzilla i econòmica, és utilitzar la tècnica de 'The Hot Needle Test', per a confirmar que no es tracta de matèria orgànica.

La Microscòpia Electrònica de Rastreig (SEM) proporciona imatges d'alta resolució de la superfície dels microplàstics. És molt utilitzada per analitzar el procés de meteorització dels polímers. Els inconvenients del mètode es basen en la laboriosa preparació de les mostres i l'elevat cost dels equips.

Però la identificació visual requereix tècniques que permetin validar els resultats, així com mètodes que permetin caracteritzar químicament els microplàstics. Amb aquesta finalitat, són molt recomanades les tècniques d'espectroscòpia.

L'espectroscòpia IR, va ser un dels primers mètodes per a identificar químicament els microplàstics. La tècnica proporciona espectres específics de cada polímer, els quals poden ser comparats amb els estàndards de referència. Un cop es van aplicar les millores de la transformació de Fourier, l'espectroscòpia IR va passar a ser una tècnica obsoleta, ja que FTIR disposa d'una millor resolució i a la vegada, proporciona informació addicional sobre el grau de degradació dels polímers. El principal avantatge del mètode, és que es tracta d'una tècnica no destructiva, fet que possibilita l'aplicació d'altres metodologies d'anàlisi amb la mateixa mostra, permet analitzar fragments petits, d'aproximadament 25µm. Però com a desavantatge, destaca l'elevat cost d'adquisició dels equips i els llargs temps d'anàlisi, però també la complexa interpretació dels resultats a causa de les interferències causades per additius i contaminants presents a la mostra.

Amb la intenció de millorar la resolució dels espectres, l'espectroscòpia de Raman permet identificar microplàstics encara més petits que FTIR, 1-2µm. Com a avantatge, té un rang més ampli d'identificació i presenta menys interferències a causa de l'aigua. Com totes les tècniques d'espectroscòpia, Raman no és una tècnica destructiva, però segueix sent una tècnica sensible a additius i contaminants que dificulten la interpretació dels espectres. A més, les mostres a les quals se'ls ha aplicat una tinció fluorescent proporcionen espectres impossibles d'interpretar, essent indispensable l'aplicació de processos de purificació previs.

En base a la limitació de la mida de partícules recol·lectades amb les xarxes d'arrossegament, entre 100-300µm segons les recomanacions de GLEON, no seria necessària l'alta resolució que proporciona Raman i, ja que el preu dels equips de FTIR són lleugerament inferiors, FTIR podria ser la tècnica més adient per a validar els resultats obtinguts en la identificació visual. Tot i això, el fet que els preus dels equips de FTIR segueixen sent elevats, podria ser interessant contactar amb un laboratori extern amb possibilitat de realitzar aquests tipus d'anàlisi i sol·licitar aquest servei per a confirmar l'origen dels fragments dubtosos o bé per determinar químicament el tipus d'un microplàstic en concret.

Les degradacions termals també podrien ser una opció per a la identificació de microplàstics, però el principal inconvenient és que es tracta de tècniques destructives, ja que analitzen els productes de degradació de les substàncies. En general, ja que aquestes tècniques estan acoblades a un espectròmetre de masses, proporcionen informació quantitativa de la massa dels microplàstics, però per contra, a causa de la degradació dels polímers, no proporciona informació sobre la mida i la forma dels microplàstics. Py-GC/MS a més, proporciona informació de la matèria orgànica present a la mostra i com a avantatge, no requereix gaire preparació de la mostra. Els inconvenients del mètode recauen en el volum de mostra analitzat, aquest és molt petit, fet que dificulta la representativitat dels resultats sobretot en mostres heterogènies. A

més la interpretació dels resultats és complexa i els equips tenen preus molt elevats, ja que es tracta d'una combinació de tres equips específics. TED-GC/MS disposa d'un límit de detecció més alt que Py-GC/MS i també permet analitzar volums de mostra superiors. Proporciona informació de la composició química dels microplàstics i de la pèrdua de massa durant l'aplicació de la tècnica. Però la dificultat d'interpretació dels resultats segueix sent elevada i els equips amb preus molt elevats. Per últim, TGA-DSC identifica microplàstics de forma senzilla i relativament ràpida i no requereix gaire preparació de les mostres abans de ser analitzades. Però per contra, es tracta d'una tècnica molt sensible a impureses presents a la mostra.

En general les degradacions termals no són tècniques sensibles a la mida i la forma dels microplàstics pel que es considera necessari complementar l'anàlisi amb tècniques de microscòpia i espectroscòpia. Tenint en compte que els preus d'adquisició dels equips són molt més elevats, l'aplicació de les degradacions termals podria ser adequada per a validar els resultats obtinguts per mètodes d'espectroscòpia, però no com a mètodes únics. Per aquest fet, es considera la millor opció realitzar una identificació visual amb un microscopi òptic i només en els casos on no s'està segur de l'origen del fragments, la utilització de mètodes d'espectroscòpia, preferiblement FTIR.

Per a determinar l'abundància de microplàstics d'una mostra, el recompte visual es considera la millor opció. Tot i que és una tècnica laboriosa, és econòmica i permet quantificar el nombre de microplàstics totals presents en una mostra.

Taula 5: Taula resum de les tècniques quantitatives i qualitatives per a l'anàlisi de microplàstics (Peñalver et al., 2020).

<b>Tècniques</b>	<b>Avantatges</b>	<b>Limitacions</b>
<b>Identificació visual</b>		
Microscòpia	Fàcil, econòmic i útil per a realitzar una caracterització prèvia.	Sobreestimació dels resultats. Possibles errors dels tècnic.
SEM	Proporciona imatges de la superfície d'alta resolució.	Requereix una laboriosa preparació de la mostra. Elevat cost dels equips.
<b>Espectroscòpia</b>		
FTIR	Proporciona informació sobre la composició química. No és destructiva. Permet detectar partícules petites (~25µm).	Instrumentes cars, treball laboriós i temps d'anàlisi llargs. Interferències a causa de l'aigua present a la mostra. Senyals sobreposades degut a la presència d'additius i contaminants.
Raman	Proporciona informació sobre la composició química. No és destructiva. Permet detectar partícules petites (1-2µm).	Instrumentes cars, treball laboriós i temps d'anàlisi llargs. Interferència a causa de la fluorescència de les mostres. Senyals sobreposades degut a la presència d'additius i contaminants.
<b>Degradacions termals</b>		
Py-GC/MS	Proporciona informació sobre la composició química dels polímers i matèria orgànica mitjançant els productes de degradació obtinguts i sobre la massa dels polímers. Permet quantificar la massa dels polímers. No requereix gaire preparació de la mostra.	Tècnica destructiva. No proporciona informació sobre la mida i la forma dels microplàstics. Dificil interpretació dels resultats. Poc representatiu per a mostres heterogènies.
TED-GC/MS	Proporciona informació de la composició química dels polímers i de la pèrdua de massa. Límit de detecció més alt. Permet analitzar més quantitat de mostra que Py-GC/MS.	Tècnica destructiva. No proporciona informació sobre la mida i la forma dels microplàstics. Dificil interpretació dels resultats
TGA-DSC	Mesura la pèrdua de pes i la temperatura de transició sota una atmosfera i temperatura controlada. Simple, ràpid i fàcil. No requereix gaire preparació de la mostra.	Tècnica destructiva. No proporciona informació sobre la mida i la forma dels microplàstics. Tècnica sensible a impureses i additius presents a la mostra.

## 4. Treball de camp

En aquest apartat del treball s'exposa la participació de GEA Research Group en el projecte GALACTIC (Global Lake microplastics) del grup GLEON (Global Lake Ecological Observatory Network), en l'obtenció de mostres d'aigua de la superfície d'un embassament per a l'anàlisi de microplàstics en sistemes aquàtics.

### 4.1 GLEON. Projecte GALACTIC

GLEON (Global Lake Ecological Observatory Network) és una xarxa formada per investigadors voluntaris, especialitzats en limnologia, ecologia, tecnologia i enginyeria, educadors i una comunitat interessada a realitzar una sèrie d'observacions de llacs i embassament d'arreu del món. Comprèn 60 embassaments mostrejats de 34 països diferents.

L'objectiu principal de GLEON és predir els impactes naturals i causats per l'home en els reservoris d'aigua, construint i escalant una xarxa d'observacions de l'ecologia dels embassaments, tot donant l'oportunitat d'adquirir nous coneixements científics gracies a la comparabilitat entre els estudis dels diferents embassaments.

Els microplàstics són un dels principals contaminants emergents que ocupen els sistemes aquàtics. Tot i que la majoria d'estudis publicats estan centrats en microplàstics presents en ecosistemes aquàtics, en els últims anys els estudis en sistemes d'aigua dolça han estat un nou camp d'importància reconegut. Tot i això, el nombre d'estudis i la informació disponible és escassa, ja que actualment encara no existeixen protocols estandarditzats pel mostreig i l'anàlisi de microplàstics en mostres d'aigua (Horton, 2017).

El projecte GALACTIC (Global Lake microplastics) té l'objectiu d'estandarditzar una metodologia per mostrejar diferents llacs i embassaments d'arreu del món per identificar l'ocurrència de microplàstics presents en les zones superficials de diferents reservoris d'aigua dolça i d'aquesta manera desenvolupar protocols de mostreig estandarditzats per a obtenir resultats fiables i comparables.

En concret, el projecte comprèn l'estudi i comparació de l'abundància de microplàstics en diferents reservoris d'aigua, així com la relació amb les característiques del embassament, població de la zona, àrea de recol·lecció, activitats agràries o industrials properes, entre d'altres.

Els diferents equips d'investigadors han de realitzar un mostreig i recol·lectar mostres d'aigua de la superfície d'un embassament, utilitzant una xarxa d'arrossegament habitualment utilitzada per a la recol·lecció de nèuston i plàncton. Les mostres seran enviades a la Universitat de Milano-Bicocca, on seran processades. Es durà a terme una extracció de la matèria orgànica i una inspecció visual per determinar la mida, la forma i el color de les partícules recol·lectades. Finalment, s'utilitzarà l'espectroscòpia FTIR per a identificar els diferents tipus de polímers.

A part dels mostrejos, tots els investigadors tindran la possibilitat de continuar col·laborant amb tasques de recerca bibliogràfica, participant en reunions virtuals, editant part dels manuscrits i participant en l'aprovació de la versió final.

## 4.2 Mostreig al Pantà de Sau

Com a part pràctica d'aquest treball, s'ha organitzat un mostreig amb la finalitat d'obtenir mostres de la superfície d'un embassament per analitzar els microplàstics presents.

### 4.2.1 Zona de mostreig

L'embassament escollit ha estat el Pantà de Sau, a la comarca d'Osona, ja que disposa de les característiques adients per a realitzar el mostreig. El Pantà de Sau forma part del Riu Ter, té una superfície de 17km d'allargada i 3km d'ample i una capacitat màxima de 151.3hm<sup>3</sup>. El Pantà de Sau forma part del poble de Vilanova de Sau, amb una població de només 300 habitants.

El mostreig consisteix a recol·lectar mostres superficials de l'aigua de l'embassament amb xarxes d'arrossegament horitzontal, a la zona pelàgica i a prop del corrent principal de sortida de l'embassament. Cal realitzar el mostreig en 4 transectes perpendiculars al corrent de sortida. La *Figura 6* mostra la geografia del Pantà de Sau senyalitzant la localització i orientació dels 4 transectes a realitzar.

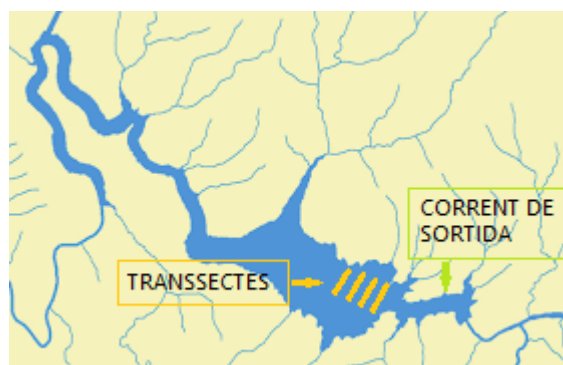


Figura 6: Geografia del Pantà de Sau amb les zones de mostreig senyalitzades.

### 4.2.2 Data de mostreig

L'època del any preferible per a realitzar els mostrejos es abans de l'arribada de la primavera, evitant els períodes on les concentracions de zooplàncton i fitoplàncton son elevades. També es recomana realitzar el mostreig sota unes bones condicions meteorològiques, evitant els dies plujosos o amb vent.

El mostreig es va organitzar per dur-lo a terme el mes de febrer del 2020, però a causa del temporal Glòria (gener 2020), el qual va provocar quantiosos danys i desperfectes a la zona del Pantà de Sau, va arrossegar grans quantitats de troncs i brutícia a la llera i les vores del riu Ter (imatges disponibles al ANNEX II). En conseqüència, les activitats recreatives al Pantà, varen estar suspeses fins a principis de Maig, coincidint amb l'inici del confinament a causa de la pandèmia mundial del SARS-Cov2, fet que ha impedit la realització del mostreig fins al moment. De totes maneres, el material i el protocol estan preparats per tal de realitzar-lo tan aviat les condicions ho permetin.

### 4.2.3 Material pel mostreig

Un cop escollida la zona de mostreig del Pantà de Sau, es va contactar amb el Club Nàutic Vic Sau per a obtenir l'autorització per a realitzar el mostreig. Club Nàutic Vic Sau, també ofereix varietat d'activitats aquàtiques en el pantà, per al que es va acordar l'arrendament d'una barca pneumàtica semirígida a motor amb una capacitat de 3-4 persones per a realitzar el mostreig.

Segons les instruccions de GLEON, es recomanen xarxes d'arrossegament amb una mida de malla, idealment entre 100-300µm, amb un diàmetre de boca de la xarxa igual o superior a 30cm. A la *Figura 7* es mostra la xarxa adquirida (30cmØx90cmL 300µm CP3- 50) de Aquatic Biotechnology, la qual disposa d'un cilindre al final de la xarxa on s'hi recol·lecten les mostres. Es recomana guardar la xarxa en una bossa de cotó, per evitar la contaminació de la xarxa a causa de fibres sintètiques.



Figura 7: Xarxa d'arrossegament CP3-50 (30cmØx90cmL 300µm CP3- 50 'Aquatic Biotechnology'), per a la recolecció de mostres en superfícies d'aigua i anàlisi de microplàstics.

Com a material per el mostreig, es requereixen cinc flascons de plàstic, preferiblement nous, per a emmagatzemar les quatre per a les mostres obtingudes en els transectes i el control. Cal enumerar els flascons amb el numero de transecte.

També es requereixen 10L d'aigua ultra purificada, per esbandir les xarxes i per a realitzar el control, el qual serà analitzat de la mateixa manera que el resta de mostres amb la finalitat de determinar possibles contaminacions per part del material, concretament de la xarxa.

El dispositiu GPS, Wikiloc, disponible com aplicació mòbil, permet a marcar el recorregut de cada transecte, recopila les dades obtingudes, determinen la velocitat mitjana i la distancia, poder proporcionar la informació precisa a l'organització del projecte. Addicionalment, es va utilitzar una aplicació mòbil, Naviotics+, per assegurar la velocitat instantània estipulada.

### 4.2.4 Protocol de mostreig

En base les instruccions genèriques proporcionades al participant del projecte GALACTIC, s'ha posat a punt un protocol de mostreig per a l'obtenció de mostres de la superfície d'embassaments d'aigua dolça (ANNEX I), el qual ha estat validat per les investigadores de GEA Research Group.

#### 4.2.4.1 Abans del mostreig

Prèviament al dia del mostreig, cal descarregar l'aplicació Wikiloc i conèixer el seu funcionament.



Cal preparar tot el material necessari i preferiblement emmagatzemar-ho en una caixa de plàstic per a facilitar el transport.

Durant el mostreig, la xarxa es disposa submergida 2/3 de la superfície de l'aigua. Per això cal marcar les xarxes abans per determinar la posició correcte d'aquesta durant tot el transecte. La xarxa cal netejar-la amb aigua ultra purificada abans de realitzar el mostreig. Un cop neta, és recomanable guardar-la en una bossa de cotó.

Cal realitzar un seguit de càlculs per determinar la durada i la longitud dels transectes, ja que varien en funció de les dimensions de la xarxa, el volum d'aigua filtrat i la velocitat del mostreig.

Amb l'Equació 1, s'ha calculat l'àrea de la xarxa on el radi de la boca de la xarxa és de 15cm. Però cal tenir present la disposició de la xarxa, aquesta es disposa submergida 2/3 de la superfície. Per al que cal aplicar una correcció per obtenir l'àrea de filtrat (Equació 2). Finalment, en base les instruccions de GLEON, on el volum d'aigua filtrat ha de ser de 50m<sup>3</sup> i la velocitat de mostreig, de 2 nusos (1.03m/s) i les característiques de la xarxa adquirida, l'Equació 3 ha permès calcular la duració concreta de cada transecte, essent de 17 minuts tot recorrent 1km de longitud en perpendicular al corrent.

$$\text{area de la xarxa} = \pi \cdot r^2$$

Equació 1: Àrea de la xarxa

$$\text{area de filtrat} = \frac{2}{3} (\text{area de la xarxa})$$

Equació 2: Àrea de filtrat

$$\text{duració del mostreig} = \frac{\text{volum}}{\text{area de filtrat} \cdot \text{velocitat}} \quad \text{On: } \text{volum} = 50\text{m}^3$$
$$\text{velocitat} = 1.03\text{m/s}$$

Equació 3: Duració del mostreig

#### 4.2.4.2 Durant el mostreig

Un cop a la zona de mostreig, cal completar les taules complementàries amb informació referida a l'embassament, al material i les condicions ambientals, així com la temperatura de l'aigua, pluges en l'últim mes, entre d'altres.

La localització de la xarxa durant el mostreig és a bavor de la barca (Michida et al., 2019), tractant de mantenir-la xarxa submergida 2/3 de la superfície de l'aigua, tal i mostra la *Figura 8*.

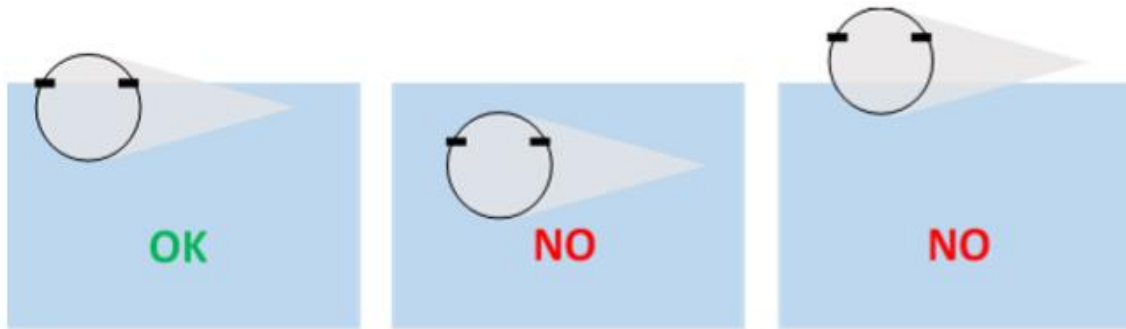


Figura 8: Posició de la xarxa d'arrossegament durant el mostreig.

Un cop iniciat cada transecte cal iniciar la ruta a l'aplicació Wikiloc i controlar la durada del transecte. També cal assegurar-se de la velocitat instantània amb l'aplicació Naviotics+.

Un cop finalitzat cada transecte, cal emmagatzemar les mostres en els flascons de plàstic. És de vital importància marcar correctament les mostres, tant amb el número de transecte com el nom de l'embassament on s'ha dut a terme el mostreig.

#### 4.2.4.3 Després del mostreig

Un cop obtingudes les mostres, cal acabar de completar les taules complementàries si encara en manca informació.

Per últim, cal compartir la informació emmagatzemada a l'aplicació Wikiloc i les taules complementàries, en un arxiu de Google Drive anomenat 'GALACTIC' i enviar les mostres a la Universitat de Milano-Bicocca (Itàlia), on es realitzaran els anàlisis pertinents.

#### 4.2.5 Discussió

El protocol de mostreig desenvolupat és considerat adient per aplicar-lo en futures investigacions del grup de recerca GEA, en l'àmbit dels microplàstics.

La metodologia proposada recomana obtenir mostres superficials d'aigua per reducció de volum, utilitzant xarxes d'arrossegament. A diferència d'altres metodologies d'obtenció de mostres, les xarxes d'arrossegament permeten analitzar grans quantitats d'aigua, fet que augmenta significativament la representativitat dels resultats. La utilització de xarxes d'arrossegament permet acotar el rang de mides de microplàstics els quals seran recol·lectats, pel que l'adquisició d'una xarxa de 300µm permetrà analitzar microplàstics d'entre 300µm i 5mm, un rang de mides interessants de cara a l'entrada de contaminants a la xarxa tròfica.

Com a millora del protocol i amb l'objectiu de reduir la contaminació de les mostres, proposo substituir els flascons de plàstic utilitzats per a emmagatzemar les mostres recol·lectades, per flascons de vidre amb l'objectiu de minimitzar la probabilitat de contaminacions de la mostra.

## 5. Conclusió

L'anàlisi de microplàstics, avui en dia, encara és tot un repte. Aquesta cerca ha permès tenir una idea clara de les metodologies de mostreig i d'anàlisi de microplàstics disponibles. Els mètodes emergents en els últims anys han millorat la capacitat per a detectar diferents mides de microplàstics, però la gran problemàtica de l'anàlisi es centra en la dificultat de la seva quantificació.

Tal com proposen la majoria d'estudis publicats, la identificació visual amb microscopis òptics, és la tècnica utilitzada per excel·lència per a la detecció de microplàstics. Disposa d'uns criteris d'identificació preestablerts que permeten caracteritzar els microplàstics en base la seva mida, forma i color, a més, permet quantificar els microplàstics presents a mostres d'aigua per determinar-ne l'abundància a la zona de mostreig. Però cal complementar-la tant per a validar els resultats com per determinar el tipus de polímer, amb tècniques d'espectroscòpia, idealment l'espectroscòpia FTIR, la qual proporcionen informació de l'estructura química dels fragments i són, a dia d'avui, la millor opció per a completar l'anàlisi de microplàstics.

Per altra banda, la participació en l'estandardització d'una metodologia de mostreig, ha permès optimitzar del protocol robust, el qual podrà ser aplicat en les futures investigacions del grup de recerca d'Ecologia Aquàtica (GEA). Tot i que fins al moment no s'ha pogut realitzar el mostreig, es preveu realitzar-lo de cara al curs vinent, amb l'objectiu de proporcionar al grup GLEON les mostres per analitzar els microplàstics presents al Pantà de Sau.

## 6. Bibliografía

- Anger, P. M., von der Esch, E., Baumann, T., Elsner, M., Niessner, R., & Ivleva, N. P. (2018). Raman microspectroscopy as a tool for microplastic particle analysis. *TrAC - Trends in Analytical Chemistry*, *109*, 214–226. <https://doi.org/10.1016/j.trac.2018.10.010>
- Araujo, C. F., Nolasco, M. M., Ribeiro, A. M. P., & Ribeiro-Claro, P. J. A. (2018). Identification of microplastics using Raman spectroscopy: Latest developments and future prospects. *Water Research*, *142*, 426–440. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2018.05.060>
- Bergmann, M., Gutow, L., & Klages, M. (2015). Marine anthropogenic litter. *Marine Anthropogenic Litter*, 1–447. <https://doi.org/10.1007/978-3-319-16510-3>
- Bollaín Pastor, C., & Vicente Agulló, D. (2019). Presencia de microplásticos en aguas y su potencial impacto en la salud pública. *Revista Espanola de Salud Publica*, *93*, 1–10.
- Bretas Alvim, C., Mendoza-Roca, J. A., & Bes-Piá, A. (2020). Wastewater treatment plant as microplastics release source – Quantification and identification techniques. *Journal of Environmental Management*, *255*(October 2019). <https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2019.109739>
- Cole, M., Lindeque, P., Halsband, C., & Galloway, T. S. (2011). Microplastics as contaminants in the marine environment: A review. *Marine Pollution Bulletin*, *62*(12), 2588–2597. <https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2011.09.025>
- Cutroneo, L., Reboa, A., Besio, G., Borgogno, F., Canesi, L., Canuto, S., Dara, M., Enrile, F., Forioso, I., Greco, G., Lenoble, V., Malatesta, A., Mounier, S., Petrillo, M., Rovetta, R., Stocchino, A., Tesan, J., Vagge, G., & Capello, M. (2020). Microplastics in seawater: sampling strategies, laboratory methodologies, and identification techniques applied to port environment. *Environmental Science and Pollution Research, PlasticsEurope 2018*. <https://doi.org/10.1007/s11356-020-07783-8>
- Fok, L., Lam, T. W. L., Li, H. X., & Xu, X. R. (2019). A meta-analysis of methodologies adopted by microplastic studies in China. *Science of the Total Environment*, *xxxx*, 135371. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2019.135371>
- Guo, X., & Wang, J. (2019). The chemical behaviors of microplastics in marine environment: A review. *Marine Pollution Bulletin*, *142*(February), 1–14. <https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2019.03.019>
- Hidalgo-Ruz, V., Gutow, L., Thompson, R. C., & Thiel, M. (2012). Microplastics in the marine environment: A review of the methods used for identification and quantification. *Environmental Science and Technology*, *46*(6), 3060–3075. <https://doi.org/10.1021/es2031505>
- Horton, A. A. (2017). *Microplastics in freshwater and terrestrial environments: evaluating the current understanding to identify the knowledge gaps and future research priorities*. 1–47.
- Karlsson, T. M., Vethaak, A. D., Almroth, B. C., Ariese, F., van Velzen, M., Hassellöv, M., & Leslie, H. A. (2017). Screening for microplastics in sediment, water, marine invertebrates and fish: Method development and microplastic accumulation. *Marine Pollution Bulletin*, *122*(1–2), 403–408. <https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2017.06.081>
- Li, C., Busquets, R., & Campos, L. C. (2020). Assessment of microplastics in freshwater systems: A review. *Science of the Total Environment*, *707*, 135578. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2019.135578>

- Li, J., Liu, H., & Paul Chen, J. (2018). Microplastics in freshwater systems: A review on occurrence, environmental effects, and methods for microplastics detection. *Water Research*, *137*, 362–374. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2017.12.056>
- Mai, L., Bao, L. J., Shi, L., Wong, C. S., & Zeng, E. Y. (2018). A review of methods for measuring microplastics in aquatic environments. *Environmental Science and Pollution Research*, *25*(12), 11319–11332. <https://doi.org/10.1007/s11356-018-1692-0>
- Meng, Y., Kelly, F. J., & Wright, S. L. (2020). Advances and challenges of microplastic pollution in freshwater ecosystems: A UK perspective. *Environmental Pollution*, *256*, 113445. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2019.113445>
- MERI “Marine & Environmental Research Institute.” (2017). *Guide to Microplastic identification*. [https://sfyl.ifas.ufl.edu/media/sfylifasufledu/flagler/sea-grant/pdf-files/microplastics/MERI\\_Guide-to-Microplastic-Identification.pdf](https://sfyl.ifas.ufl.edu/media/sfylifasufledu/flagler/sea-grant/pdf-files/microplastics/MERI_Guide-to-Microplastic-Identification.pdf)
- Michida, Y., Chavanich, S., Cabañas, A. C., & Hagmann, P. (2019). *Guidelines for Harmonizing Ocean Surface Microplastic Monitoring Methods*. July, 1–71.
- Naik, R. K., Naik, M. M., D’Costa, P. M., & Shaikh, F. (2019). Microplastics in ballast water as an emerging source and vector for harmful chemicals, antibiotics, metals, bacterial pathogens and HAB species: A potential risk to the marine environment and human health. *Marine Pollution Bulletin*, *149*(August), 110525. <https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2019.110525>
- Peñalver, R., Arroyo-Manzanares, N., López-García, I., & Hernández-Córdoba, M. (2020). An overview of microplastics characterization by thermal analysis. *Chemosphere*, *242*. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2019.125170>
- Pinto da Costa, J., Reis, V., Paço, A., Costa, M., Duarte, A. C., & Rocha-Santos, T. (2019). Micro(nano)plastics – Analytical challenges towards risk evaluation. *TrAC - Trends in Analytical Chemistry*, *111*, 173–184. <https://doi.org/10.1016/j.trac.2018.12.013>
- Prata, J. C., da Costa, J. P., Duarte, A. C., & Rocha-Santos, T. (2019). Methods for sampling and detection of microplastics in water and sediment: A critical review. *TrAC - Trends in Analytical Chemistry*, *110*, 150–159. <https://doi.org/10.1016/j.trac.2018.10.029>
- Rios Mendoza, L. M., & Balcer, M. (2019). Microplastics in freshwater environments: A review of quantification assessment. *TrAC - Trends in Analytical Chemistry*, *113*, 402–408. <https://doi.org/10.1016/j.trac.2018.10.020>
- Stock, F., Kochleus, C., Bänisch-Baltruschat, B., Brennholt, N., & Reifferscheid, G. (2019). Sampling techniques and preparation methods for microplastic analyses in the aquatic environment – A review. *TrAC - Trends in Analytical Chemistry*, *113*, 84–92. <https://doi.org/10.1016/j.trac.2019.01.014>
- Wang, W., & Wang, J. (2018). Investigation of microplastics in aquatic environments: An overview of the methods used, from field sampling to laboratory analysis. *TrAC - Trends in Analytical Chemistry*, *108*, 195–202. <https://doi.org/10.1016/j.trac.2018.08.026>
- Xu, S., Ma, J., Ji, R., Pan, K., & Miao, A. J. (2020). Microplastics in aquatic environments: Occurrence, accumulation, and biological effects. *Science of the Total Environment*, *703*, 134699. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2019.134699>

# Annex I

## PROTOCOL DE MOSTREIG DE MICROPLÀSTICS

### Introducció

Gran quantitat de residus plàstics s'acumulen en els ecosistemes aquàtics, on son fragmentats en petits fragments anomenats microplàstics. A causa de la ingesta de microplàstic per part dels organismes, permeten la seva incorporació en la cadena alimentaria. Són substàncies tòxiques per els organismes, per el que causen un gran impacte per els ecosistemes aquàtics.

Tot i que la recerca de microplàstics en ecosistemes marins es troba al capdavant, en els últims anys s'ha reconegut la importància d'estudis en reservoris d'aigua dolça. Encara no es disposa de protocols estandarditzats pel mostreig de micosplàstics, per això GLEON ha proposat unes instruccions generals per tal d'obtenir resultats comparables.

Cal seguir el protocol per a realitzar el mostreig al Pantà de Sau, el qual proporciona informació detallada de les tasques a realitzar abans, duran i després de la presa de mostres.

### Objectius

Obtenció de mostres de la superfície del embassament, amb la finalitat d'analitzar els microplàstics d'entre 300µm a 5mm.

### Material necessari

- Barca a motor per a 3 persones
- Xarxa d'arrossegament (30cmØx90cmL 300µm CP3- 50)
- Bossa de cotó per guardar la xarxa
- Flascons de plàstic nous
- Aigua ultra purificada MiliQ 10L
- Caixa per transportar el material
- Dispositiu amb GPS 'Wikiloc' descarregat en el mòbil
- Marcador per identificar els flascons
- Controlador de velocitat – Aplicació mòbil
- Protocol de mostreig i graelles complementàries

### 1. Tasques prèvies al mostreig

- 1.1 Cal descarregar l'aplicació GPS 'Wikiloc', disponible tant per dispositiu iOS i Android i adquirir una idea bàsica del seu funcionament.

- 1.2 Preparar com a mínim 5 flascons de plàstic (200-500ml) i esbandir-los amb aigua ultra purificada. Els flascons haurien de ser nous per reduir la possible alliberació de fragments plàstics per part del recipient.
- 1.3 Esbandir la xarxa amb aigua ultra purificada. Cal guardar-la en una bosses de cotó per evitar la contaminació per fibres.
- 1.4 Marcar la boca de la xarxa aproximadament a 2/3 de l'àrea tal i com s'observa a la *Figura 9*, per tal de delimitar l'àrea de filtratge. Tenint present que el diàmetre de a boca de la nostra xarxa es de 30 cm, s'hauran de realitzar les marques a 20 cm.

Figura 9: Exemple de la marca a realitzar a la boca de la xarxa per delimitar l'àrea de filtrat (GALACTIC, 2020).

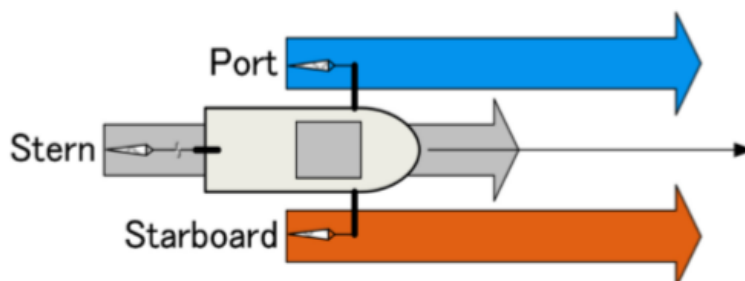


- 1.5 Cal preparar una mostra control per verificar que no hi ha contaminació per part de l'equipament. Cal filtrar 5L d'aigua purificada per la xarxa i recol·lectar l'aigua en un dels flascons retolat com a "BLANK" ("SAU\_BLANK").
- 1.6 Retolar els altres flascons indicant el numero de mostreig del 1 al 4, indicant les diferents repiques. "SAU\_1", "SAU\_2", "SAU\_3", "SAU\_4".

## 2. Durant el mostreig

- 2.1 Anotar tota la informació sol·licitada a les taules, així com la data, les condicions meteorològiques, etc.
- 2.2 Col·locar la xarxa a bavor (part dreta) de la barca, tal i com s'observa a la *Figura 10*.

Figura 10: Imatge mostrant la localització de la xarxa d'arrossegament durant les acitivitats de mostreig (GALACTIC, 2020).



- 2.3 Inicia la ruta amb el 'Wikiloc' en el moment que s'inicia el mostreig. Cal mantenir la xarxa en el nivell marcat prèviament durant tot el mostreig.
- 2.4 La velocitat de la barca ha de ser de 2kts (1.03m/s).

- 2.5 La duració del mostreig depèn de l'àrea de boca de la xarxa. L'objectiu és filtrar com a mínim 50m<sup>3</sup> d'aigua en cada mostreig. Per el que en el nostre cas, en que la xarxa és de 30cm, el mostreig ha de durar 17 minuts (fent un recorregut de 1km de longitud).  
*EQUACIÓ 1*
- 2.6 Un cop realitzat el primer mostreig, cal parar i guardar la ruta a 'Wikiloc', anotant la duració exacta del mostreig.
- 2.7 Abocar el continguts dels cilindres de recol·lecció en el flascó numero 1. Tancar la sortida del flascó i esbandir la xarxa amb l'aigua del pantà des del exterior evitant que entri l'aigua per la boca de la xarxa. Recol·lectar l'aigua del cilindre i guardar-la en el mateix flascó, numero 1. Repetir aquesta operació 3 cops.
- 2.8 Repetir totes les operacions des del punt 2.2 fins al 2.7. per els tres mostrejos restants per així finalment recol·lectar un total de 4 mostres.

$$duració\ del\ mostreig = \frac{volum}{area\ de\ filtrat \cdot velocitat} \quad (1)$$

### 3. Després del mostreig.

- 3.1 Completa la informació de les taules i comparteix-la a Google Drive 'GALACTIC' amb el nom 'SAU\_data'.
- 3.2 Descarrega els fitxers GPX del GPS 'Wikiloc' i comparteix-lo també en el Google Drive 'GALACTIC' amb el nom 'SAU\_GPX\_nº de mostreig'. 3.3. Les 5 mostres obtingudes, les del mostreig i el Blanc no requereixen un emmagatzematge en fred.
- 3.3 Enviar tan aviat sigui possible les mostres a la següent direcció:  
*Barbara Leoni*  
*Università di Milano-Bicocca*  
*Piazza della Scienza 1, Edificio U1,*  
*20126 Milano (MI), Italy*
- 3.4 Enviar un correu a [v.nava15@campus.unimib.it](mailto:v.nava15@campus.unimib.it) i a [barbara.leoni@unimib.it](mailto:barbara.leoni@unimib.it), informant que les mostres han estat enviades.



## Annex II

Imatges dels efectes del temporal Glòria al Pantà de SAU (Gener 2020), extretes de la pàgina web del Club Nàutic Vic Sau. <https://www.vicsau.com/temporal-gloria-actuacions>



