

Caracterización de microplásticos en muestras medioambientales mediante adquisición de imágenes por microscopía infrarroja directa por láser y bibliotecas generadas por el usuario

Análisis rápido de microplásticos mediante un sistema de adquisición de imágenes químicas con LDIR Agilent 8700 y bibliotecas espectrales de creación sencilla



Autores

Wesam Alwan y Darren Robey
Agilent Technologies, Inc.

Resumen

En esta nota de aplicación se identifica la composición química de los microplásticos procedentes de varios trozos de plástico de gran tamaño recogidos en las playas de Sorrento, Victoria (Australia). La identificación química se consiguió gracias a un método de análisis de partículas completamente automatizado diseñado para el sistema de adquisición de imágenes químicas con infrarrojos directos por láser (LDIR) Agilent 8700. El estudio también demuestra la facilidad de uso y la simplicidad a la hora de crear bibliotecas mediante el software de control del instrumento Agilent Clarity LDIR.

Introducción

La contaminación de vías fluviales, suelos, aire y agua potable provocada por los microplásticos está despertando un gran interés público, debido en gran parte a su irrupción como amenaza medioambiental.¹ La cantidad de partículas presentes en el agua abarca varias órdenes de magnitud, por lo que el posible impacto nocivo de la exposición a los microplásticos se ha convertido en un tema candente dentro de la comunidad científica.

Los métodos convencionales de caracterización de microplásticos suelen conllevar el uso de microscopía, siendo una de las técnicas más habituales la microscopía con Raman e infrarrojo por transformada de Fourier (FTIR). Sin embargo, ambas tecnologías requieren una recogida de datos que conlleva un tiempo prolongado, a menudo días, para procesar una sola muestra. Para solucionar el problema que suponen los tiempos de análisis de muestras, existe la necesidad de encontrar técnicas rutinarias más rápidas para identificar los polímeros y obtener datos sobre el recuento de partículas y su tamaño. El sistema de adquisición de imágenes químicas con LDIR 8700 ofrece una forma automatizada, rápida y sencilla de caracterizar los microplásticos y permite llevar a cabo análisis de rutina de las partículas contaminantes de pequeño tamaño que se encuentran presentes en el medio ambiente (Figura 1).

La fuente de infrarrojos del sistema LDIR 8700 es un láser de cascada cuántica (QCL) basado en semiconductores. Mediante el QCL, los electrones se tunelizan a través de una serie de pozos cuánticos y emiten luz. Estas propiedades permiten que el QCL se sintonice rápidamente a través del intervalo de número de onda (λ^{-1}) de 1.800 a 975 cm^{-1} . Si se combina con un detector de telururo de mercurio y cadmio (MCT) de un solo punto refrigerado de forma termoeléctrica



Figura 1. Sistema de adquisición de imágenes químicas con LDIR Agilent 8700.

y un sistema óptico de barrido rápido, surgen dos modos de funcionamiento muy útiles. En el primero de ellos, el sistema LDIR selecciona una sola longitud de onda y hace un barrido a través del objetivo mientras se mueve sobre la muestra a gran velocidad. En el segundo modo, el objetivo permanece fijo en un único punto mientras el QCL hace un barrido de todo el rango de longitud de onda, obteniendo un espectro completo en menos de un segundo.

El estudio demuestra la sencillez y la simplicidad a la hora de crear una biblioteca en el software Agilent Clarity para identificar los microplásticos que se generan a partir de las muestras de plástico recogidas en las playas australianas. Los microplásticos se caracterizaron mediante un método de análisis de partículas completamente automatizado diseñado para LDIR 8700 en el que la introducción de datos por parte del usuario era mínima.

Experimento

Generación de bibliotecas

Para validar el rendimiento de la confianza en la identificación del método LDIR 8700, se generó una pequeña biblioteca a partir de polímeros puros sintéticos al 100 %. Se crearon microplásticos con diferentes formas y tamaños (a partir de SP2 Scientific Polymer Products Inc, estado de Nueva York, EE. UU.; kit de muestras de polímeros, número de referencia 205) mediante la molienda de sedimentos de muestras puras en un molinillo de café para producir un polvo amorfo. El polvo (~10 mg) se suspendió en etanol absoluto (núm. de CAS: 64-17-5) y se trasladó a portaobjetos de vidrio reflectantes de infrarrojos (7,5 x 2,5 cm; MirrIR, Kevley Technologies, Ohio, EE. UU.) mediante pipetas. Los plásticos que contenía la biblioteca que se generó se enumeran en la Tabla 1.

Tabla 1. Polímeros incluidos en la biblioteca LDIR generada por el usuario.

| Tipo | Abreviatura | Núm. de cat. del material de referencia | Forma cuando se suministra |
|-------------------------------|-------------|---|----------------------------|
| Poli(tetrafluoroetileno) | PTFE | 203 | Polvo |
| Metacrilato de polimetilo | PMMA | 377 | Polvo |
| Politereftalato de etileno | PET | 138 | Sedimentos |
| Policarbonato | PC | 035 | Sedimentos |
| Poliestireno | PS | 039A | Sedimentos |
| Polipropileno, isotáctico | PP | 130 | Sedimentos |
| Nailon 6 [poli(caprolactama)] | PA | 034 | Sedimentos |

Se obtuvieron dos o tres espectros por cada tipo de polímero a partir de partículas de distintos tamaños y se añadieron a la biblioteca. El software Clarity permite a los usuarios gestionar de forma sencilla las bibliotecas y los espectros. Una vez se obtienen los datos LDIR de las muestras y los patrones, el espectro de interés se puede agregar a la biblioteca, tal y como se describe en el siguiente procedimiento y en la Figura 2.

1. Haga clic en el icono "Añadir a la biblioteca" (aparece en la Figura 2).
2. Introduzca un nombre para la biblioteca. En la Figura 2, el nombre de la biblioteca es "Biblioteca local Agilent".
3. Para desbloquear la biblioteca y permitir la incorporación de los espectros, haga clic en el icono del candado.
4. Tras el análisis, seleccione el espectro de interés.
5. Para agregar el espectro a la biblioteca, marque la casilla de verificación que se encuentra junto al nombre de la biblioteca correspondiente.
6. Para comprobar que se ha añadido el espectro, abra la biblioteca espectral.
7. En el menú desplegable, seleccione la biblioteca que desee.
8. Seleccione el espectro que se ha añadido en el paso 4 y cambie el nombre como corresponda. En la Figura 2, se ha cambiado el nombre del espectro a "polipropileno".

Una vez que se ha generado la biblioteca, los datos que se han recogido previamente se pueden volver a analizar mediante un proceso rápido y sencillo, tal y como se describe en el siguiente procedimiento y en la Figura 3.

1. Seleccione la flecha de reprocesamiento en el archivo de análisis de partículas.
2. Seleccione la biblioteca correspondiente del menú desplegable.
3. Haga clic en el icono de verificación.
4. Aparece un nuevo archivo de análisis de partículas y se pueden comprobar los nuevos datos estadísticos.

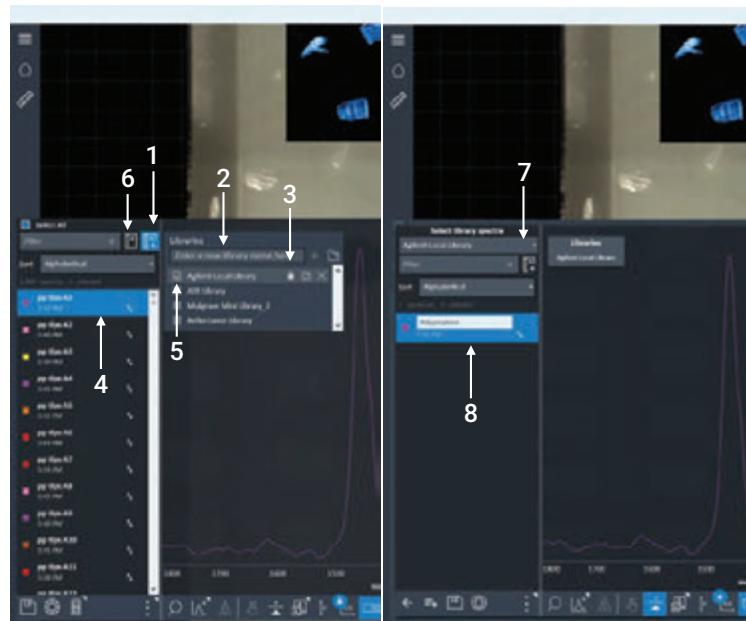


Figura 2. Pasos para la generación de bibliotecas mediante el software Agilent Clarity.

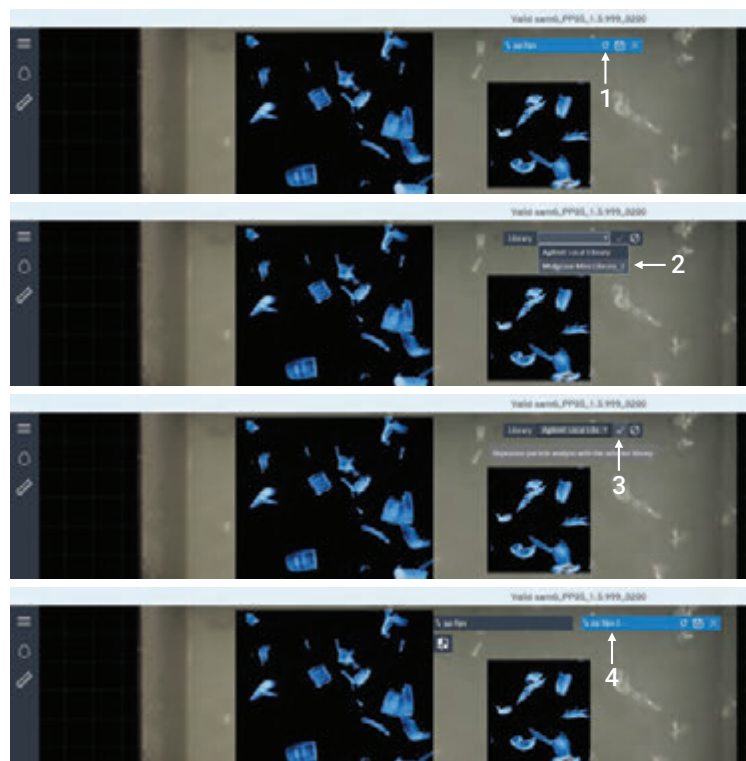


Figura 3. Pasos de reprocesamiento de datos de cualquier espectro de bibliotecas generadas o transferidas mediante el software Agilent Clarity.

Preparación de muestras

Los restos de plásticos se recogieron de forma aleatoria en la playa de Sorrento, Victoria (Australia). En este estudio se seleccionaron dos muestras con degradación medioambiental visible (Figura 4).

Para producir partículas de microplásticos de tamaños y formas irregulares, se rallaron las muestras con una cuchilla. Las partículas se trasladaron a viales y se suspendieron en 1 ml de etanol absoluto (núm.de CAS: 64-17-5) sin llevar a cabo ningún tipo de procesamiento posterior. La partícula o suspensión de etanol se trasladó a dos portaobjetos de vidrio reflectantes de infrarrojos (7,5 x 2,5 cm; MirrIR, Kevley Technologies, Ohio, EE. UU.) mediante pipetas. La punta de la pipeta se cortó manualmente para ampliar la abertura de forma que pudiera alojar partículas de un tamaño máximo de 1.000 µm. Todos los pasos de preparación de partículas de microplásticos se llevaron a cabo en una campana de extracción de flujo de aire laminar para minimizar la contaminación por aire.

Sistema de adquisición de imágenes químicas con LDIR 8700

En este estudio se empleó un sistema de adquisición de imágenes químicas con LDIR 8700 controlado por el software Clarity. Los portaobjetos de vidrio reflectantes de infrarrojos con las partículas de microplásticos de cada muestra se cargaron en el sistema LDIR 8700 y se analizaron mediante el método "Análisis-partículas", completamente automatizado, del software Clarity. Los parámetros de configuración del método que se utilizaron en la adquisición de datos se enumeran en la Tabla 2. Los parámetros del instrumento se habían configurado en los ajustes predeterminados del instrumento.

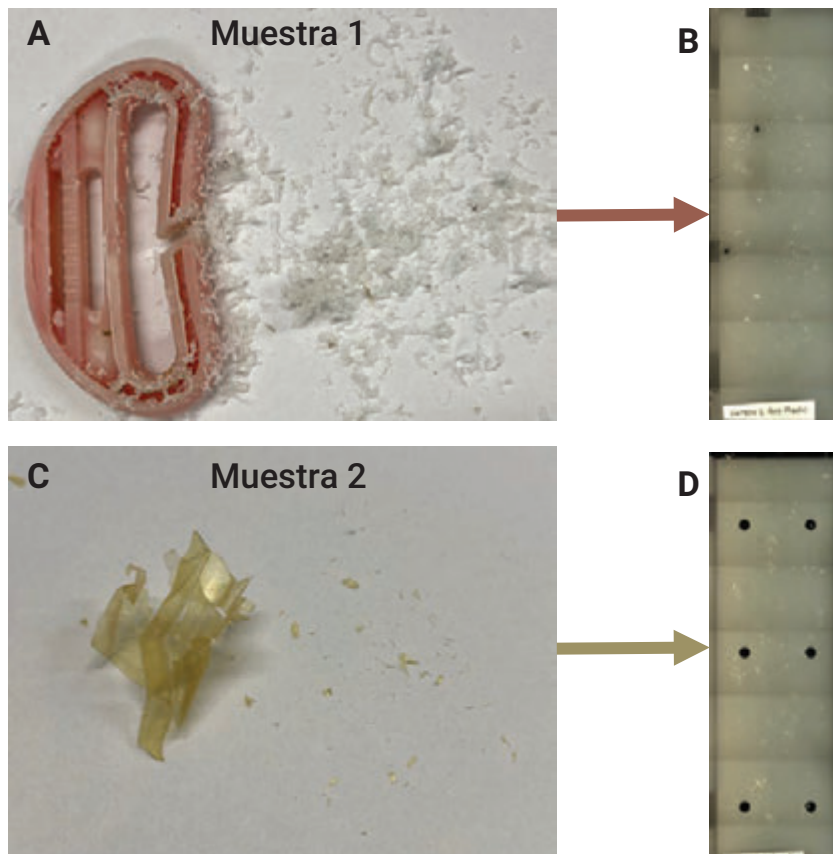


Figura 4. (A) Microplásticos generados a partir de la muestra 1: un plástico rojo y blanco. (B) Microplásticos de la muestra 1 transferidos a portaobjetos de vidrio reflectantes de infrarrojos. (C) Microplásticos generados a partir de la muestra 2: película amarilla. (D) Microplásticos de la muestra 2 transferidos a portaobjetos de vidrio reflectantes de infrarrojos.

Tabla 2. Parámetros empleados en el método automatizado LDIR Agilent 8700 para el análisis de microplásticos.

| Parámetro | Ajuste |
|--|--|
| Método | Análisis-partículas |
| Biblioteca utilizada | Prueba de rendimiento: biblioteca generada por el usuario |
| Tamaño mínimo de partícula que se debe detectar (µm) | 20 |
| Tamaño máximo de partícula que se debe detectar (µm) | 600 |
| Recoger imágenes visibles | Sí |
| Intervalo de clasificación de tamaño (µm) | De 0 a 30 De 30 a 50 De 50 a 100 De 100 a 200 De 200 a 300 De 300 a 600 |
| Velocidad de barrido | Predeterminada (8) |
| Velocidad de barrido | Predeterminada (3, velocidad elevada) |
| Compensación de enfoque | 0 |
| Polarización (grado) | Predeterminada (0) |
| Atenuación (%) | Predeterminada (0)/automática |

FTIR Cary 630 combinado con un módulo ATR

Para confirmar de forma más precisa la identidad de las muestras 1 y 2, se combinó un espectrómetro FTIR Agilent Cary 630 con un módulo de reflectancia total atenuada (ATR) con diamante (Figura 5). Se empleó la biblioteca espectral FTIR “Polímeros ATR y aditivos de polímeros” que se encuentra disponible en Agilent (referencia G8045AA, opción 106) en un método de búsqueda en bibliotecas mediante la aplicación del algoritmo de búsqueda “Similarity” con los parámetros que se muestran en la Tabla 3. La biblioteca espectral contiene 7.974 espectros de polímeros, plásticos, aditivos de polímeros, plastificadores y materiales de relleno seleccionados.

Resultados y comentarios

El método Análisis-partículas de Clarity empleó tanto el barrido LDIR como los modos de espectro completo. Primero, se utilizó el modo de barrido para barrer rápidamente la superficie de la muestra para un solo número de onda. La imagen IR resultante se usó para localizar las partículas en la muestra y determinar los límites de cada partícula. Una vez localizadas, el sistema LDIR se desplazó de forma inmediata y automática hasta cada partícula y adquirió un espectro completo del rango de longitud de onda. Los espectros se compararon con la biblioteca de espectros de microplásticos en tiempo real. Se determinó y notificó la coincidencia más similar al espectro para cada partícula. El sistema 8700 empleó una cámara de campo de visualización amplio para obtener una panorámica completa de la muestra y un objetivo microscópico para capturar imágenes con un gran aumento.



Figura 5. Espectrómetro FTIR Agilent Cary 630 combinado con un módulo ATR con diamante.

Tabla 3. Parámetros de funcionamiento del sistema FTIR-ATR Agilent Cary 630.

| Parámetro | Ajuste |
|------------------------|---------------------------------------|
| Método | Búsqueda en una biblioteca |
| Biblioteca utilizada | Polímeros ATR y aditivos de polímeros |
| Algoritmo de búsqueda | Similarity |
| Intervalo espectral | De 4.000 a 650 cm^{-1} |
| Barridos del fondo | 64 |
| Barridos de la muestra | 64 |
| Resolución espectral | 16 cm^{-1} |
| Adquisición del fondo | Aire |

Entre los tipos de microplásticos que se identificaron en la muestra 1 se encontraban el polipropileno (74,8 %), un tipo no definido (17,0 %), la poliamida (6,8 %) y la poliacrilamida (1,4 %). En el caso de la muestra 2, el polímero más abundante era el cloruro de polivinilo (85,4 %), la poliamida (10,9 %), la poliacrilamida (2,2 %) y un tipo no definido (1,5 %).

El software Clarity genera de forma automática estadísticas sobre todos los microplásticos identificados y los datos se actualizan de forma automática durante el análisis. Las partículas se pueden destacar en la zona de barrido y se pueden codificar por colores en función de la identificación del tipo de microplástico, tal y como se muestra en las Figuras 6 y 7. Entre otras estadísticas se incluye la distribución del tamaño de

partícula según los intervalos definidos por el usuario. En las Figuras 6D y 7D aparece un resumen de la distribución del intervalo de tamaños de las partículas en un gráfico comparado con la cantidad de partículas que se han observado por muestra. Dentro del intervalo de tamaños del estudio de 20 a 600 μm , el tamaño de la mayoría de las partículas oscilaba entre 20 y 200 μm , tal y como se muestra en las Figuras 6 y 7.

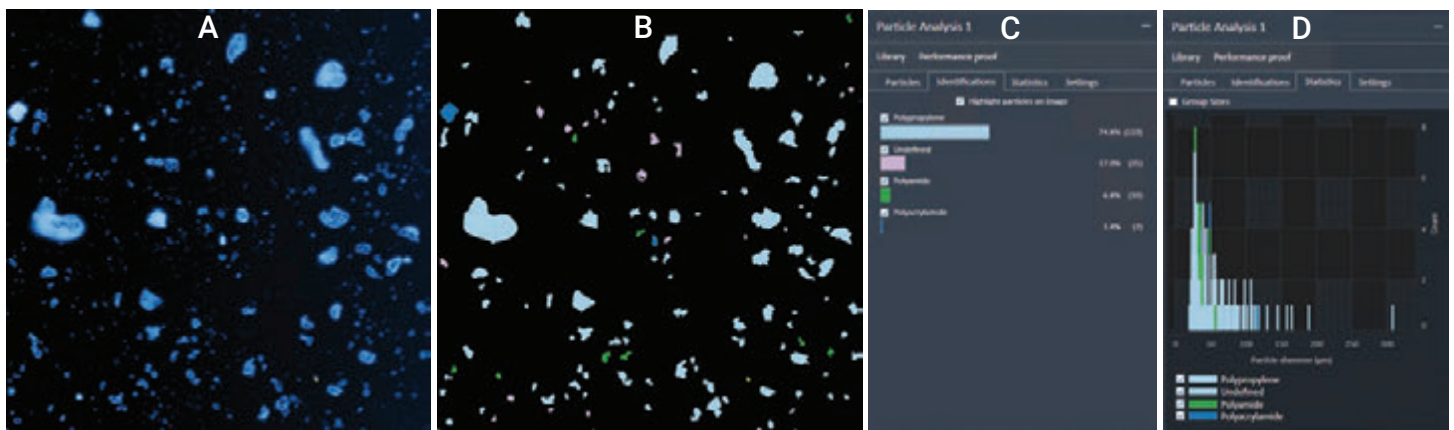


Figura 6. Caracterización de microplásticos de la muestra 1 mediante el sistema LDIR Agilent 8700. (A) Imagen IR de la muestra 1 con barrido a 1.800 cm^{-1} . (B) Partículas resaltadas que se encontraron en la muestra 1: los colores de las partículas varían en función de la identificación del tipo de microplásticos. (C) Datos estadísticos automáticos de la muestra 1 generados en función de la identificación de los microplásticos. (D) Datos estadísticos de las partículas de los microplásticos según los distintos intervalos de tamaño de la muestra 1.

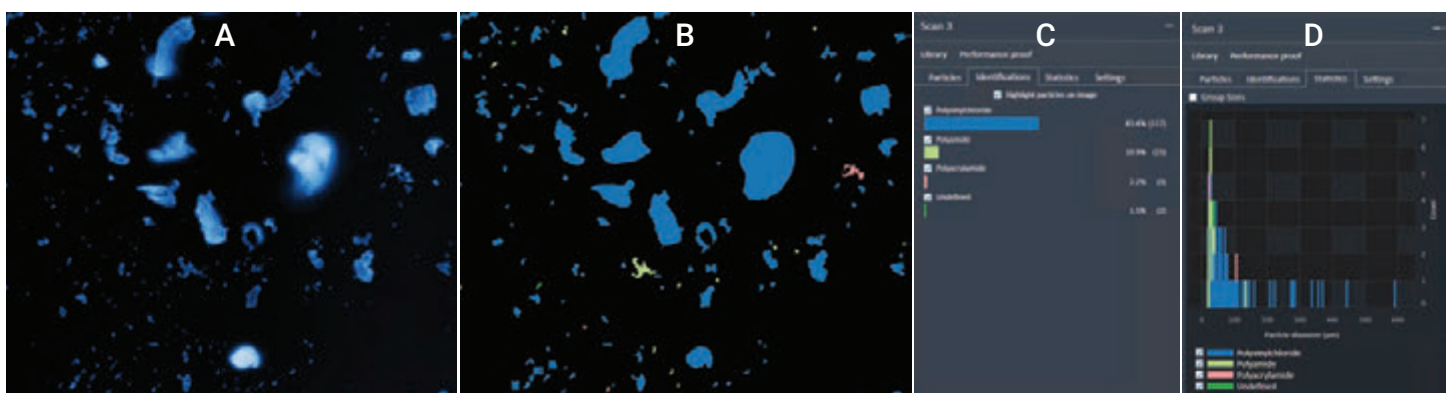


Figura 7. Caracterización de microplásticos de la muestra 2 mediante el sistema LDIR Agilent 8700. (A) Imagen IR de la muestra 2 con barrido a 1.800 cm^{-1} . (B) Partículas resaltadas que se encontraron en la muestra 2: los colores de las partículas varían en función de la identificación del tipo de microplásticos. (C) Datos estadísticos automáticos de la muestra 2 generados en función de la identificación de los microplásticos. (D) Datos estadísticos de las partículas de los microplásticos según los distintos intervalos de tamaño de la muestra 2.

Confianza en la identificación de las muestras 1 y 2

Los usuarios pueden verificar la identificación en el software Clarity en función de un nivel de confianza elevado, medio y bajo y de una puntuación del Índice de calidad de la coincidencia (HQI), en el que la cifra 1,0 es una coincidencia idéntica a la de la biblioteca. En el 71,4 % de los microplásticos en la muestra 1 y el 78,8 % de los microplásticos en la muestra 2 se observaba un valor HQI > 0,8, tal y como se resume en la Tabla 4.

El método de análisis de microplásticos LDIR automatizado ofreció valores elevados de HQI tanto en partículas pequeñas (~20 µm) como en las de tamaño grande (200 µm). Por ejemplo, en la muestra 1, se identificaron las partículas A128 (22.99 µm) y A2 (189.06 µm) como polipropileno con una puntuación de calidad de coincidencia de 0,946 y 0,963 respectivamente (Figura 8). En la muestra 2, se identificaron las partículas A130 (20 µm) y A10 (210 µm) como cloruro de polivinilo con una puntuación de calidad de coincidencia de 0,934, tal y como se muestra en la Figura 9.

Tabla 4. Análisis de las muestras 1 y 2 con el método automatizado LDIR Agilent 8700.

| | Muestra 1 | Muestra 2 |
|--|---|--|
| Descripción de la muestra | Plástico rojo y blanco | Película amarilla |
| Zona de barrido (mm ²) | 3,04 × 3,06 | 3,76 × 4,42 |
| Número de partículas detectadas | 147 | 137 |
| Tamaño de los microplásticos detectados en función de su diámetro | | |
| De 0 a 30 µm | 36 (24,5 %) | 42 (33,7 %) |
| De 30 a 50 µm | 57 (38,8 %) | 39 (28,5 %) |
| De 50 a 100 µm | 41 (27,9 %) | 32 (23,4 %) |
| De 100 a 200 µm | 12 (8,2 %) | 14 (10,2 %) |
| De 200 a 300 µm | 1 (0,7 %) | 5 (3,7 %) |
| De 300 a 600 µm | 0 (0,0 %) | 5 (3,7 %) |
| Tipos de microplásticos detectados | Polipropileno 110 (74,8 %) Sin definir 25 (17,0 %) Poliamida 10 (6,8 %) Poliacrilamida 2 (1,4 %) | Cloruro de polivinilo 117 (85,4 %) Poliamida 15 (10,9 %) Poliacrilamida 3 (2,2 %) Sin definir 2 (1,5 %) |
| Calidad de la coincidencia | | |
| De 0,9 a 1,0 | 92 (62,6 %) | 63 (46,0 %) |
| De 0,8 a 0,89 | 13 (8,8 %) | 45 (32,9 %) |
| De 0,7 a 0,79 | 8 (5,4 %) | 24 (17,5 %) |
| < 0,7 | 34 (23,1 %) | 5 (3,7 %) |

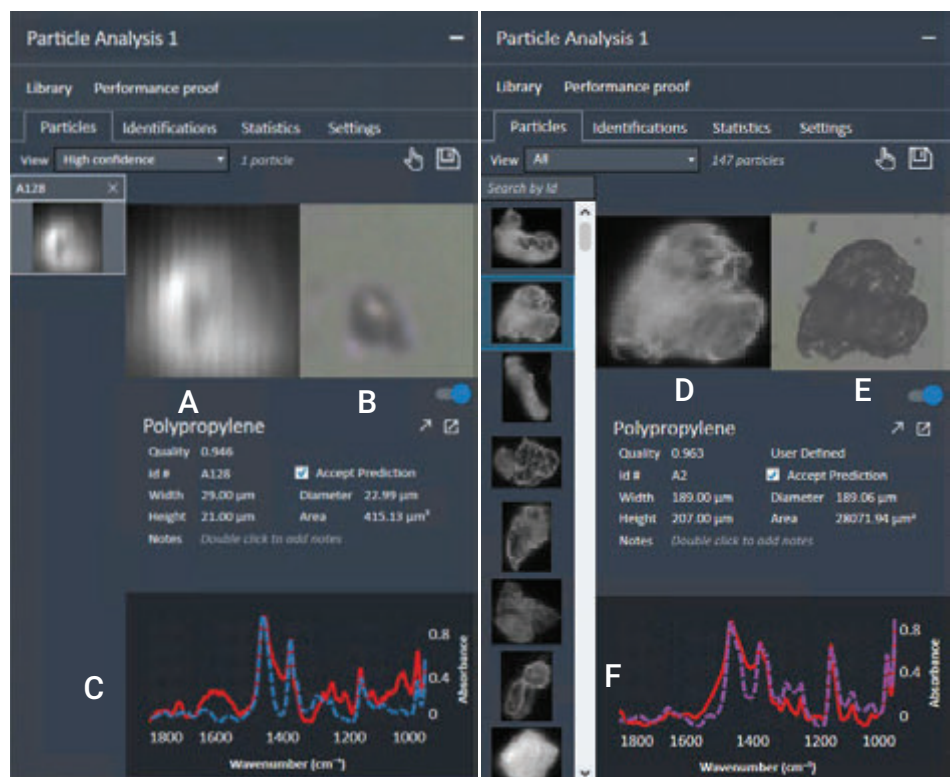


Figura 8. Información sobre el tamaño y la calidad de la coincidencia de las partículas de la muestra 1 obtenida mediante el software Agilent Clarity. (A) Imagen IR de la partícula A128. (B) Imagen visible de la partícula A128. (C) Solapamiento del espectro de A128 (línea roja) y del espectro coincidente de la biblioteca (línea discontinua azul). (D) Imagen IR de la partícula A2. (E) Imagen visible de la partícula A2. (F) Solapamiento del espectro de A2 (línea roja) y del espectro coincidente de la biblioteca (línea discontinua morada).

Confirmación del ID del material mediante FTIR Cary 630

Se llevó a cabo otra confirmación del tipo de material de las muestras 1 y 2 mediante el espectrómetro FTIR Cary 630 combinado con un ATR con diamante. Las muestras en polvo se colocaron en el cristal ATR y se recogieron los datos correspondientes mediante los parámetros que se enumeran en la Tabla 3. El espectro que se recogió se comparó con los polímeros ATR y los aditivos de los polímeros para confirmar la identidad de las muestras mediante el software Microlab. En la muestra 1 se identificó una mezcla de polipropileno y poli(propileno coetileno) con una calidad del 0,922, tal y como se muestra en la Figura 10. En la muestra 2 se identificó cloruro de polivinilo con una calidad de coincidencia de 0,969, tal y como se muestra en la Figura 11. El ID que se obtuvo en las muestras 1 y 2 coincidía con los datos que se habían obtenido con el sistema de adquisición de imágenes químicas con LDIR 8700.

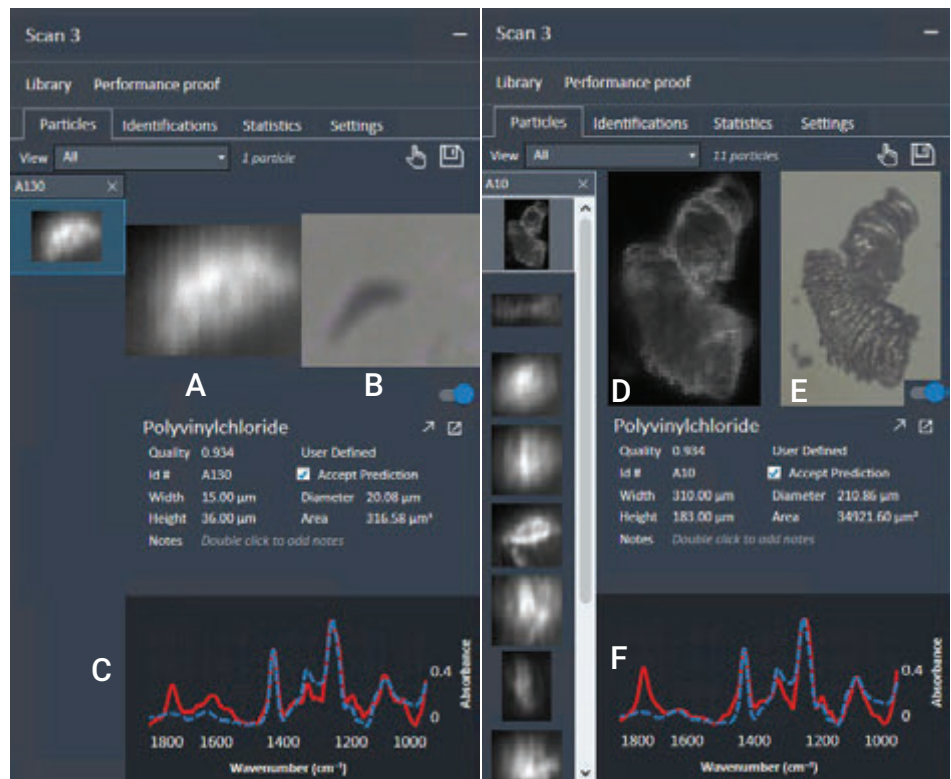


Figura 9. Información sobre el tamaño y la calidad de la coincidencia de las partículas de la muestra 2 obtenida mediante el software Agilent Clarity. (A) Imagen IR de la partícula A130. (B) Imagen visible de la partícula A130. (C) Solapamiento del espectro de A130 (línea roja) y del espectro coincidente de la biblioteca (línea discontinua azul). (D) Imagen IR de la partícula A10. (E) Imagen visible de la partícula A10. (F) Solapamiento del espectro de A10 (línea roja) y del espectro coincidente de la biblioteca (línea discontinua morada).

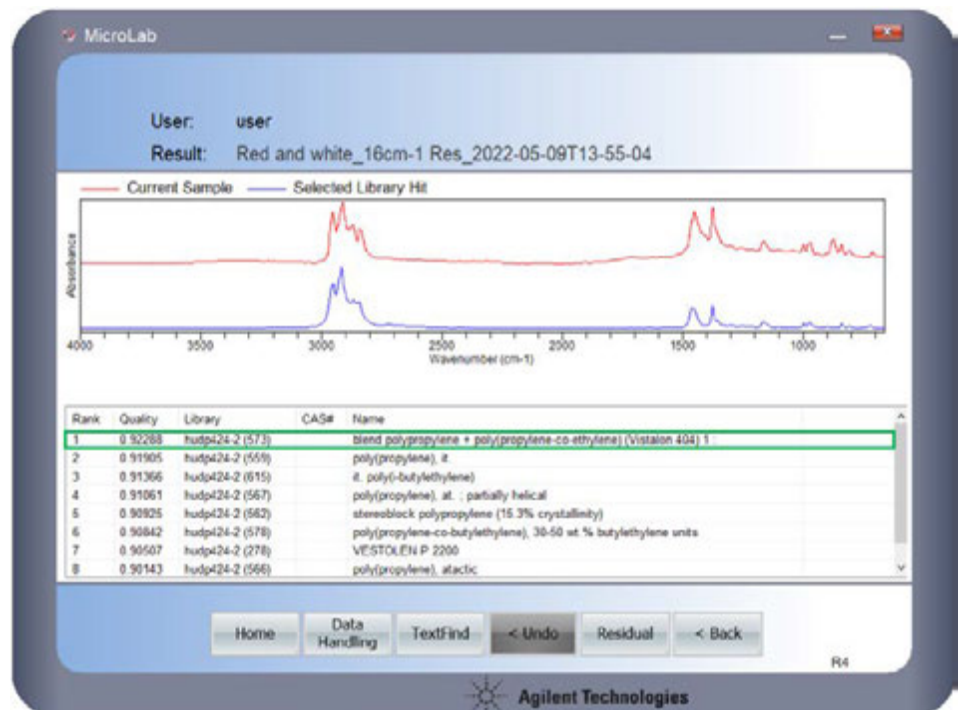


Figura 10. Análisis cuantitativo FTIR Agilent Cary 630 de la muestra 1 (traza roja); coincidencia de la biblioteca (traza azul). En la tabla se muestran la calidad de la coincidencia, la biblioteca empleada y el nombre de la coincidencia.

Conclusión

El estudio demuestra que el sistema de adquisición de imágenes químicas con LDIR Agilent 8700 puede clasificar y diferenciar de forma satisfactoria microplásticos que se han obtenido a partir de muestras medioambientales con una mínima interacción del usuario. El método de análisis de partículas completamente automatizado con el software Agilent Clarity es una forma eficaz para los usuarios de obtener información sobre el tamaño de las partículas, su distribución y la identificación de microplásticos. Los usuarios pueden crear con rapidez sus propias bibliotecas siguiendo unos sencillos pasos en el software Clarity.

El sistema LDIR 8700, junto con una biblioteca generada por el usuario, obtuvo identificaciones de gran calidad de la mayor parte de los microplásticos que se analizaron en las muestras. La identidad de los microplásticos se verificó mediante FTIR Agilent Cary 630 con ATR, que confirmó la precisión del método LDIR 8700.

Referencia

1. Laskar *et al.* Plastics and Microplastics: A Threat to Environment. *Environmental Technology & Innovation* **2019**, *14*, 100352. [10.1016/j.eti.2019.100352](https://doi.org/10.1016/j.eti.2019.100352), <https://doi.org/10.1016/j.eti.2019.100352>



Figura 11. Análisis cuantitativo FTIR Agilent Cary 630 de la muestra 2 (traza roja); coincidencia de la biblioteca (traza azul). En la tabla se muestran la calidad de la coincidencia, la biblioteca empleada y el nombre de la coincidencia.