



UNIVERSIDADE DA CORUÑA

Facultade de Ciencias

## Grao en Química

### Memoria do Traballo de Fin de Grao

**Metais en bioplásticos e o seu risco para a saúde humana**

**Metales en bioplásticos y su riesgo para la salud humana**

**Metals in bioplastics and their risk to human health**

**Fernando Verdeal Cousillas**

**Curso: 2022 - 2023.**

**Convocatoria: setembro**

*Directora 1: Alatzne Carlosena Zubieta*

*Directora 2: Rosa María Soto Ferreiro*

# ÍNDICE

---

ABREVIATURAS Y ACRÓNIMOS .....	3
CRONOGRAMA .....	4
RESUMEN.....	5
RESUMO .....	6
ABSTRACT .....	7
OBJETIVOS .....	8
1. INTRODUCCIÓN.....	9
1.1 Plásticos alternativos: Bioplásticos .....	9
1.1.1 Bioplásticos de origen no renovable biodegradables .....	10
1.1.2 Bioplásticos de origen renovable no biodegradables .....	10
1.1.3 Bioplásticos de origen renovable biodegradables .....	11
1.2 Microplásticos derivados de bioplásticos .....	18
1.3 Metales en microplásticos derivados de bioplásticos. ....	19
1.4 Bioaccesibilidad y biodisponibilidad de metales presentes en microplásticos. ....	21
1.5 Legislación.....	23
1.6 Determinación de metales.....	24
2. PARTE EXPERIMENTAL.....	27
2.1 Materiales y reactivos.....	27
2.2 Instrumentación .....	28
2.3 Preparación de las muestras.....	29
2.4 Procedimiento de digestión ácida asistida por energía de microondas.....	30

2.5 Procedimiento de digestión gástrica <i>in vitro</i> .....	30
2.6 Determinación de metales mediante espectroscopía de masas con plasma acoplado inductivamente (ICP-MS) .....	31
2.6.1 Condiciones instrumentales .....	31
2.6.2 Linealidad .....	32
2.6.3 Límites de detección y cuantificación.....	35
2.6.4 Precisión.....	37
3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	38
3.1 Ensayos de adsorción metálica.....	38
3.2 Ensayos de digestión humana <i>in vitro</i> . .....	40
4. CONCLUSIONES.....	45
BIBLIOGRAFÍA.....	47
ANEXOS.....	53
ANEXO 1: PREPARACIÓN DE LAS DISOLUCIONES DE LA DIGESTIÓN GÁSTRICA <i>IN VITRO</i> .....	53
ANEXO 2: RECTAS DE CALIBRADO Y ADICIÓN.....	55

## ABREVIATURAS Y ACRÓNIMOS

---

3HB	Ácido 3-hidroxibutírico
3HV	Ácido 3-hidroxivalérico
AAS	Espectroscopía de absorción atómica
bio-PE	Bio-polietileno
D	Dializado
DER	Desviación estándar relativa
EEUU	Estados Unidos
ICP-MS	Espectrometría de Masas con Plasma de Acoplamiento Inductivo
LDD	Límite de detección
LDC	Límite de cuantificación
MPs	Microplásticos
ND	No Dializado
OES	Espectroscopía de emisión óptica
PCL	poli $\epsilon$ -caprolactona
PET	Tereftalato de polietileno
PHAs	Polihidroxialcanoatos
PHB	Poli(3-hidroxibutirato)
PHBv	Poli(3-hidroxibutirato-co-3-hidroxivalerato)
PGA	Poliácido glicólico
PLA	Ácido poliláctico
PP	Polipropileno
PS	Poliestireno
PVC	Cloruro de polivinilo
QANAP	Grupo Química Analítica Aplicada
SAI	Servicio de apoyo a la investigación, UDC
UDC	Universidade da Coruña
UE	Unión Europea
XRF	Espectrometría de fluorescencia de rayos X

## CRONOGRAMA

---

A continuación se muestra un cronograma de las principales actividades que se han realizado para el desarrollo del presente trabajo.

	<i>Búsqueda bibliográfica</i>	<i>Trabajo de laboratorio</i>	<i>Cálculos e interpretación de resultados</i>	<i>Redacción de la memoria</i>
<b>2022</b>				
<i>Septiembre</i>				
<i>Octubre</i>				
<i>Noviembre</i>				
<b>2023</b>				
<i>Junio</i>				
<i>Julio</i>				
<i>Agosto</i>				
<i>Septiembre</i>				

## RESUMEN

---

El presente Trabajo de Fin de Grado se centra en el estudio de la problemática derivada de los bioplásticos a nivel de la salud humana, evaluando el grado de incorporación a nuestro organismo de metales que estén presentes en microplásticos (MPs) de bioplásticos comerciales. Para ello se simula el proceso digestivo humano y así determinar la bioaccesibilidad y la biodisponibilidad de los siguientes elementos: Cd, Co, Cr, Cu, Hg, Mn, Ni, Pb, Sb y Sn. Los bioplásticos ensayados son: ácido poliláctico (PLA), poli(3-hidroxibutirato) (PHB) y poli(3-hidroxibutirato-co-3-hidroxivalerato) (PHBv). Estos materiales se someten a un proceso previo de adsorción metálica, para simular su contaminación en el medio marino. Para conocer el contenido metálico total de estos microplásticos se llevó a cabo una digestión ácida asistida con energía de microondas. Todos los metales ensayados se retienen en los MPs, en concentraciones de 2 a 10 veces superiores a las iniciales. Destaca el contenido inicial de Sn en el PLA (25 µg/g), siendo para los demás elementos inferiores a 5 µg/g.

Los microplásticos sobrecargados se someten al proceso *in vitro* y se determina el contenido metálico de las fracciones bioaccesibles y biodisponibles mediante espectrometría de masas con plasma de acoplamiento inductivo (ICP-MS). Todos los metales son bioaccesibles, en mayor o menor medida, en los tres bioplásticos. En cuanto a la biodisponibilidad, Cu, Sn, Sb y Pb no se cuantificaron en esta fracción. Para los demás metales, se alcanzaron porcentajes entre el 2 % y 15 %, excepto para el Hg en el PHBv con un 30 %.

Se comprueba la capacidad de los MPs de bioplásticos de adsorber metales del medio marino, así como de poder liberarlos en el proceso digestivo humano, si bien la mayor parte es bioaccesible pero no biodisponible.

**Palabras clave:** bioplásticos, microplásticos, metales, bioaccesibilidad, biodisponibilidad, digestión gástrica *in vitro*.

## RESUMO

---

O presente Traballo de Fin de Grao céntrase no estudo da problemática derivada dos bioplásticos a nivel da saúde humana, avaliando o grao de incorporación ao noso organismo de metais que estean presentes en microplásticos (MPs) de bioplásticos comerciais. Para iso, simúlase o proceso dixestivo humano e así determinar a bioaccesibilidade e a biodisponibilidade dos seguintes elementos: Cd, Co, Cr, Cu, Hg, Mn, Ni, Pb, Sb e Sn. Os bioplásticos ensaiados son: ácido poliláctico (PLA), poli(3-hidroxi-butirato) (PHB) e poli(3-hidroxi-butirato-co-3-hidroxi-valerato) (PHBV). Estes materiais sométense a un proceso previo de adsorción metálica, para simular a súa contaminación no medio mariño. Para coñecer o contido metálico total destes microplásticos levouse a cabo unha dixestión ácida asistida con enerxía de microondas.

Todos os metais ensaiados retéñense nos MPs, en concentracións de 2 a 10 veces superiores ás iniciais. Destaca o contido inicial de Sn no PLA (25 µg/g), sendo para os demais elementos inferiores a 5 µg/g. Os microplásticos sobrecargados sométense ao proceso *in vitro* e determinase o contido metálico das fraccións bioaccesibles e biodisponibles mediante espectrometría de masas con plasma de acoplamento inductivo (ICP-MS). Todos os metais son bioaccesibles, en maior ou menor medida, nos tres bioplásticos. En canto á biodisponibilidade, Cu, Sn, Sb e Pb non se cuantificaron nesta fracción. Para os demais metais, alcanzáronse porcentaxes entre o 2 % e o 15 %, excepto para o Hg no PHBV cun 30 %. Compróbase a capacidade dos MPs de bioplásticos de adsorber metais do medio mariño, así como de poder liberalos no proceso dixestivo humano, aínda que a maior parte é bioaccesible pero non biodisponible.

**Palabras chave:** bioplásticos, microplásticos, metais, bioaccesibilidade, biodisponibilidade, dixestión gástrica *in vitro*.

## ABSTRACT

---

The present Final Degree Project focuses on studying the issues related to bioplastics concerning human health, evaluating the degree of incorporation of metals present in microplastics (MPs) from commercial bioplastics into our bodies. To achieve this, the human digestive process is simulated to determine the bioaccessibility and bioavailability of the following elements: Cd, Co, Cr, Cu, Hg, Mn, Ni, Pb, Sb, and Sn. The tested bioplastics are polylactic acid (PLA), poly(3-hydroxybutyrate) (PHB), and poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) (PHBv). These materials undergo a prior metal adsorption process to simulate their contamination in the marine environment. To determine the total metal content of these microplastics, acid digestion with microwave energy was performed. All tested metals are retained in the MPs, at concentrations 2 to 10 times higher than the initial ones. The initial Sn content in PLA (25 µg/g) stands out, whereas for the other elements, it is below 5 µg/g.

The spiked microplastics are subjected to an *in vitro* process, and the metal content of the bioaccessible and bioavailable fractions is determined using inductively coupled plasma mass spectrometry (ICP-MS). All metals are bioaccessible to some extent in all three bioplastics. Regarding bioavailability, Cu, Sn, Sb, and Pb were not quantified in this fraction. For the other metals, percentages between 2 % and 15 % were reached, except for Hg in PHBv, which had a 30 % bioavailability.

The ability of bioplastic MPs to adsorb metals from the marine environment and potentially release them in the human digestive process is confirmed, although most are bioaccessible but not bioavailable.

**Keywords:** bioplastics, microplastics, metals, bioaccessibility, bioavailability, *in vitro* gastric digestion.



## OBJETIVOS

---

El presente Trabajo de Fin de Grado se centra en el estudio de la problemática derivada de los bioplásticos a nivel de la salud humana.

Como objetivo general se pretende evaluar el grado de incorporación a nuestro organismo de metales que estén presentes en microplásticos de bioplásticos comerciales. Para ello se llevará a cabo una simulación del proceso digestivo humano que incluye las diferentes etapas del mismo así como los agentes más importantes en cada una de ellas, que permite determinar la bioaccesibilidad y la biodisponibilidad de los siguientes elementos: Cd, Co, Cr, Cu, Hg, Mn, Ni, Pb, Sb y Sn. Los bioplásticos ensayados son: ácido poliláctico (PLA), poli(3-hidroxi-butirato) (PHB) y poli(3-hidroxi-butirato-co-3-hidroxi-valerato) (PHBv).

Los objetivos específicos de este trabajo se resumen a continuación:

- Realizar una revisión bibliográfica sobre los antecedentes del tema a abordar.
- Llevar a cabo los ensayos que permitan evaluar la bioaccesibilidad y biodisponibilidad metálica utilizando el método *in vitro* de digestión gástrica seleccionado.
- Realizar el tratamiento de los datos experimentales para obtener la información requerida.
- Comentar y discutir los resultados obtenidos y compararlos con los datos bibliográficos.

# 1. INTRODUCCIÓN

---

El presente Trabajo de Fin de Grado se centra en el estudio de la presencia de metales en nuevos plásticos alternativos o bioplásticos y el posible riesgo que pueden suponer para la salud humana cuando se encuentran como microplásticos en el medio ambiente.

## 1.1 Plásticos alternativos: Bioplásticos

Dentro de la búsqueda de soluciones para la contaminación ambiental provocada por los residuos plásticos a nivel mundial, ha cobrado un gran interés en los últimos años el desarrollo de plásticos alternativos para sustituir a los plásticos convencionales, es decir, los que derivan de fuentes fósiles.

Los plásticos alternativos, o verdes, se pueden englobar bajo el término **bioplástico**, aunque se deben tener en cuenta ciertas consideraciones. Dentro de los bioplásticos se suelen englobar tanto los plásticos biobasados como los plásticos biodegradables, pudiendo estos últimos derivar de fuentes no renovables.

Los **plásticos biobasados** son aquellos materiales producidos por sistemas biológicos, como animales, plantas o microorganismos; englobándose dentro de los biopolímeros. No obstante, también pueden ser sintetizados químicamente siendo sus unidades poliméricas derivadas de sistemas biológicos como por ejemplo aminoácidos, azúcares, lípidos, etc.

Pero no todos los plásticos biobasados tienen capacidad para biodegradarse, no siendo por tanto **plásticos biodegradables**. La biodegradación es un proceso químico, físico o biológico que, en función de los efectos de la radiación solar, humedad, cambios de temperatura o microorganismos, convierte los materiales plásticos en sustancias naturales como agua, dióxido de carbono y biomasa.

Por otra parte, se debe tener en cuenta la compostabilidad de los materiales plásticos, ya que no todo plástico biodegradable es compostable. Esta característica está regulada por normas y hace referencia a una biodegradabilidad superior al 90 % de un material

plástico y tener una cierta calidad de compost para considerarse como compost [Asham et al., 2023].

A continuación, se describen los principales bioplásticos, divididos en tres grandes grupos en función de su origen y biodegradabilidad.

### 1.1.1 Bioplásticos de origen no renovable biodegradables

Éstos son aquellos que provienen de recursos petroquímicos pero que tienen la capacidad de desintegrarse (en condiciones de compost, es decir, son compostables). Estos bioplásticos supusieron un gran avance, ya que, si bien su origen sigue siendo de una fuente no renovable como el petróleo, aún pueden ser aprovechados. Dentro de este grupo se encuentran algunos polímeros como el PCL (poli  $\epsilon$ -caprolactona), el PGA (poliácido glicólico) (Figura 1) que tienen su aplicación en el ámbito médico debido a su buena biocompatibilidad y su degradación, ya que se absorben rápidamente por el organismo. (Mohamed et al., 2016; Thakur et al., 2021).

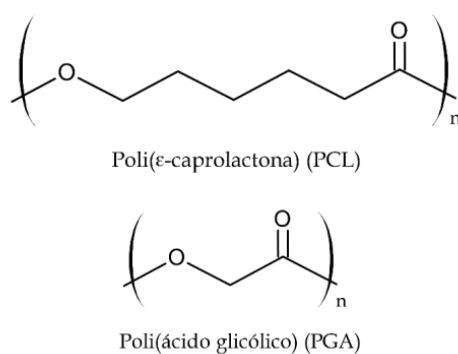


Figura 1. Estructuras químicas del PCL y PGA

### 1.1.2 Bioplásticos de origen renovable no biodegradables

Son aquellos susceptibles de obtenerse de manera parcial o total a partir de recursos renovables. Son químicamente idénticos a sus equivalentes petroquímicos y, al igual que estos, no son susceptibles de biodegradación (Andreeßen & Steinbüchel, 2019).

Una de las ventajas de este grupo de biopolímeros es que presentan un menor impacto ambiental al compararlos con sus homólogos petroquímicos, ya que provienen de fuentes renovables, reduciendo así la huella de carbono. Otro aspecto importante para considerar es que sus propiedades físicas y químicas se equiparan bastante a su homólogo.

Uno de los más utilizados en este grupo es el bio-polietileno (bio-PE), el cual es producido a partir del etileno que se obtiene del etanol, el cual a su vez se obtiene de la fermentación de la caña de azúcar, almidón de maíz y almidón de trigo. Según datos del 2021, los materiales bioplásticos estuvieron constituidos por un 64,2% de materiales biodegradables y un 35,8% de materiales procedentes de materia orgánica y no biodegradables.

Una de las limitaciones de este grupo es la escasa disponibilidad que hay para conseguir sus precursores, además del alto costo de producción (European Bioplastics, 2021).

En la Figura 2 se muestran las estructuras de varios polímeros que pertenecen a este grupo.

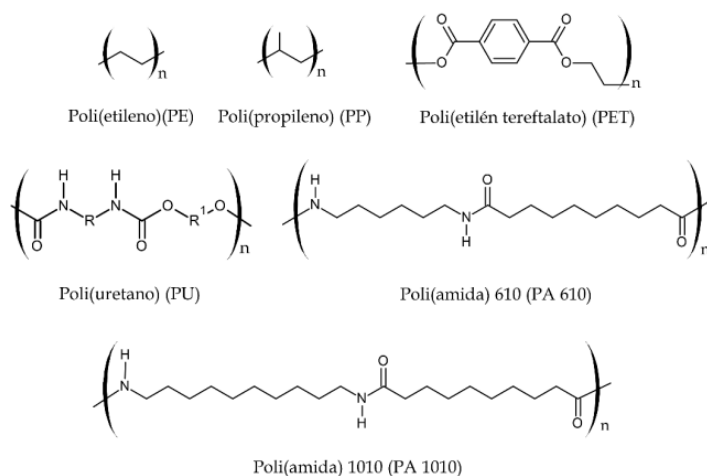


Figura 2. Estructuras químicas de biopolímeros de origen no renovable biodegradables

### 1.1.3 Bioplásticos de origen renovable biodegradables

Este grupo de bioplásticos es uno de los más prometedores, ya que son obtenidos a partir de fuente renovables y, además, son biodegradables bajo condiciones controladas. Éstos abordan dos frentes cruciales en la reducción del impacto medioambiental causado por los plásticos convencionales.

Sin embargo, es importante mencionar que presentan limitaciones en términos de propiedades y costos. Por lo tanto, la investigación actual se centra, no solo en obtenerlos, sino también en modificarlos para mejorar sus propiedades. El objetivo principal es convertirlos en materiales de alto rendimiento y con un impacto ambiental favorable (Kumar & Thakur, 2017).

Como se puede apreciar en la Figura 3, podemos dividirlos en 3 subgrupos:

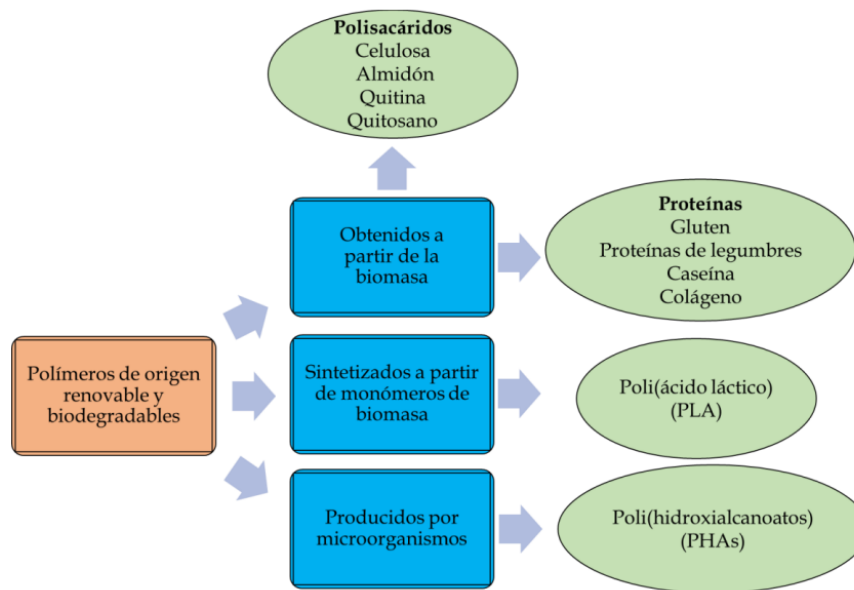


Figura 3. Clasificación de Biopolímeros de Origen Renovable Biodegradables

- Obtenido a partir de la biomasa:

En este grupo se incluyen las proteínas y polisacáridos tanto de origen vegetal como animal.

Dentro del grupo de las proteínas vegetales, las derivadas de legumbres se destacan como el segundo subgrupo más significativo. La proteína de soja es la representante principal debido a su amplia disponibilidad en la naturaleza, la capacidad de biodegradación y el coste reducido, entre otros factores. Éstas desempeñan un papel fundamental en la producción de películas y recubrimientos debido a su flexibilidad, comestibilidad y compatibilidad con alimentos. Además, ofrecen propiedades de barrera notables frente a los gases en comparación con los lípidos o polisacáridos. No obstante, presentan limitaciones en términos de propiedades mecánicas y de barrera al vapor de

agua debido a su naturaleza hidrofílica (Ahmed et al., 2016; Song et al., 2011; Garrido et al., 2018).

Dentro de las proteínas de origen animal, la gelatina se destaca como uno de los ejemplos más relevantes. Ésta es obtenida a partir de colágeno y posee la capacidad de disolverse en agua. Una de sus ventajas distintivas es la capacidad para formar geles transparentes, lo cual resulta altamente deseable en diversas aplicaciones. Además, la gelatina es muy similar al colágeno natural, lo que amplía sus posibilidades de uso en áreas emergentes como la ingeniería de tejidos en el campo biomédico. Por otro lado, se emplea ampliamente en aplicaciones farmacéuticas y alimentarias, donde ha ganado su reconocimiento por su capacidad para formar películas. Entre las características más destacadas se encuentran su bajo coste, su capacidad de biodegradación y de compostaje (Reddy et al., 2013; Molinaro et al., 2015).

Los polímeros derivados de polisacáridos constituyen la materia prima renovable más abundante. Se caracterizan porque son biocompatibles, biodegradables y no presentan toxicidad. Esto los convierte en candidatos con alto potencial para ser utilizados en ámbitos médicos y de envasado de alimentos.

Algunas de las desventajas que presentan son su baja resistencia al agua y por lo tanto su débil barrera frente al vapor de agua. Como en otros casos, la posible mejora de sus propiedades es viable mediante la modificación química. Además, se pueden mezclar con otros biopolímeros que permitan reforzar sus propiedades (Nešić et al., 2019; Nechita & Roman, 2020).

Dentro de los polisacáridos de origen vegetal destaca la celulosa, que es el polímero natural más abundante a nivel mundial. Se encuentra en plantas, bacterias, algas y en algunos animales marinos (Poletto, 2015)). Sin embargo, se obtienen principalmente a partir de la madera y el algodón, mientras que la pulpa de celulosa se puede obtener de subproductos agrícolas como el bagazo, tallos y pajas de cultivo (Nechita & Roman, 2020).

La celulosa está formada por unidades de  $\beta$ -D- anhidroglucopiranosas unidas por enlaces O-Glucosídicos  $\beta$  (1 $\rightarrow$ 4), como se muestra en la Figura 4. Su utilización ha crecido debido a su disponibilidad, su bajo costo y sus buenas propiedades mecánicas (Liu et al., 2021).



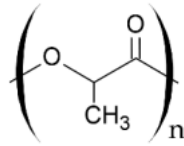


Figura 6. Estructura química del PLA

El PLA es un material termoplástico biodegradable, de gran rigidez y transparencia, similares al poliestireno (PS) o tereftalato de polietileno (PET), lo que lo ha convertido en uno de los materiales más explorados debido a sus características y su costo competitivo de producción.

La manera más común de obtenerlo es mediante polimerización por condensación directa a partir de ácido láctico, derivado de la fermentación de azúcares de carbohidratos provenientes de la caña de azúcar, maíz, patata, etc. El proceso de síntesis puede involucrar varias etapas, incluyendo la fermentación, la purificación y la polimerización.

En la etapa de fermentación, los azúcares presentes en el almidón o la caña de azúcar se convierten en ácido láctico mediante la acción de microorganismos como las bacterias del ácido láctico. Luego, el ácido láctico se purifica para eliminar impurezas y obtener un producto de alta calidad.

La polimerización del ácido láctico se puede llevar a cabo mediante diferentes métodos, como la policondensación o la polimerización por apertura de anillo. En la policondensación, se utilizan catalizadores, generalmente metales, y se generan subproductos como agua. En la polimerización por apertura de anillo, se utiliza un iniciador para iniciar la reacción de polimerización y formar cadenas de PLA (Murariu & Dubois, 2016; Groot et al., 2022).

Dentro de las características más importantes se encuentran las buenas propiedades mecánicas, térmicas, durabilidad y transparencia al compararse con otros polímeros biodegradables. Ésta última característica lo convierte en un material idóneo para su uso en productos de envasado y embalaje. Actualmente, ya se usa en productos como contenedores, botellas, películas flexibles para recubrimientos y blísteres. Además, tienen la ventaja de que al final de su ciclo de vida se pueden biodegradar bajo



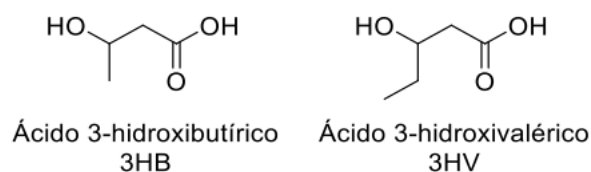
condiciones de compost. Por lo tanto, el desarrollo de materiales de PLA constituye una opción viable para reemplazar a los plásticos convencionales (Groot et al., 2022).

- Obtenido a partir de microorganismos:

Son los materiales que se producen a partir de microorganismos. Entre ellos destacan los polihidroxicanoatos (PHAs) como los más representativos (Lu et al., 2009). Éstos son poliésteres biológicos son producidos por una amplia variedad de bacterias Gram-negativas y Gram-positivas (más de 300 identificadas hasta ahora que proceden, principalmente de la familia Halobacteriaceae) como material de almacenamiento intracelular de carbono y energía (Raza et al., 2018).

Los PHAs varían en su estructura y propiedades (flexibilidad, cristalinidad, temperatura de fusión, etc.) de acuerdo con el tipo de microorganismo que los produce, la fuente de carbón sobre la cual las células crecen, la forma en que el carbón es metabolizado en las células, así como el número de átomos de carbono en las unidades monoméricas individuales y la estructura física de esos monómeros durante su incorporación en las cadenas poliméricas mediante enzimas bacterianas (Lu et al., 2009).

Los PHAs incluyen un amplio grupo de polímeros y copolímeros. Entre los más comerciales destaca el poli(3-hidroxiбутирато) (PHB), cuyas características térmicas y mecánicas son similares al polipropileno (PP). El PHB es un homopolímero con una elevada rigidez y cristalinidad. Además, presenta una alta inestabilidad a temperaturas cercanas a su punto fusión (Tsui et al., 2013). Su peso molecular, al igual que el de otros tipos de PHAs, depende básicamente, de la fuente de la cual se produce, las condiciones de crecimiento y el método de extracción (Raza et al., 2018). Otro PHA comercial es el poli(3-hidroxiбутирато-co-3-hidroxiвалерато) (PHBv) que ha reemplazado en algunas aplicaciones al PHB debido a que presenta una temperatura de fusión mayor, lo que le permite tener una ventana de procesamiento más amplia. Además, presenta mejores propiedades físicas, destacando una mayor flexibilidad y baja cristalinidad (Masood, 2017). Ambos son materiales termoplásticos que se producen a partir de bacterias que fermentan azúcares. La fórmula química del PHBv es similar a la del PHB, ya que también es un poliéster que consiste en unidades repetidas de hidroxibutirato (Figura 7). La diferencia es que el PHBv también contiene grupos vinilo en su cadena polimérica, lo que le confiere propiedades mecánicas y térmicas mejoradas (Dai et al., 2007).



*Figura 7. Estructuras Químicas del PHB y PHBv*

La reacción de polimerización para la síntesis de PHB implica la utilización de microorganismos como bacterias y levaduras que producen este biopolímero como un producto de desecho. La síntesis ocurre a través de la condensación de dos moléculas de ácido beta-hidroxibutírico (3-hidroxibutirato) para formar un enlace éster y liberar una molécula de agua. Este proceso se repite para formar la cadena polimérica (Kourmentza et al., 2017).

La síntesis de PHBv se realiza mediante un proceso de fermentación en el que los microorganismos utilizan fuentes de carbono, como glucosa o ácido acético, y nitrógeno como fuente de nutrientes. La síntesis del copolímero se controla mediante la regulación de las condiciones de cultivo, como la temperatura, el pH y la concentración de nutrientes. Durante la polimerización, los monómeros de 3HB (ácido 3-hidroxibutírico) y 3HV (ácido 3-hidroxivalérico) se unen mediante enlaces éster, formando así el copolímero PHBv. La proporción de los monómeros utilizados en la síntesis determina las propiedades físicas y mecánicas del material final (Waheed et al., 2021). En ambas síntesis se utilizan diferentes catalizadores metálicos para facilitar la polimerización de los monómeros y la formación de las cadenas poliméricas.

Este grupo se considera como una opción viable en diferentes campos como sustitutos de los polímeros petroquímicos, elastómeros e incluso algunos polímeros de uso masivo como el poli(etileno) o el poli(propileno).

Los PHAs presentan una importante biocompatibilidad en diferentes medios. También cuentan con una importante biocompatibilidad, lo que permite su uso en aplicaciones médicas en ámbitos como la liberación controlada de fármacos, implantes, etc. Por otro lado, los PHAs pueden emplearse como películas flexibles de diferente espesor, dentro de las cuales se encuentran las membranas semipermeables, filamentos, adhesivos y materiales para envasado (contenedores, botellas, etc.) (Volova, 2004).

## 1.2 Microplásticos derivados de bioplásticos

Los microplásticos (MPs) son pequeños fragmentos plásticos (inferiores a 5 mm) que pueden ser clasificados en dos categorías principales: primarios y secundarios. Los primarios son aquellos que se producen y utilizan específicamente para fines industriales o de consumo, como las microesferas en productos de cuidado personal y limpieza. Éstos pueden ser liberados directamente en el medio ambiente a través del uso de estos productos, y son considerados una fuente significativa de microplásticos en el medio marino.

Los secundarios son aquellos que se forman a partir de la degradación de objetos de plástico más grandes, como botellas y envases. Éstos pueden ser liberados en el medio ambiente a través de procesos naturales, como la erosión y la degradación solar, o por la actividad humana (Gewert et al., 2015).

Los microplásticos tienen un impacto ambiental significativo. Debido a su pequeño tamaño, pueden ser ingeridos por una amplia variedad de organismos acuáticos y terrestres, lo que puede provocar efectos adversos en la salud y el comportamiento de los animales. Además, también pueden actuar como vectores para la propagación de contaminantes y productos químicos en el medio ambiente. Los microplásticos también pueden impactar en la salud humana a través de la ingesta de alimentos contaminados y la inhalación de partículas finas (Mason et al., 2016). Por lo que consideran una amenaza ambiental debido a su persistencia y amplia distribución.

La descomposición de los bioplásticos también puede generar microplásticos, aunque la velocidad de descomposición y la cantidad y tamaño de los MPs pueden variar según el tipo de bioplástico.

La biodegradabilidad depende de la naturaleza química del polímero y de factores ambientales como la temperatura, la humedad y el pH, entre otras. Por lo tanto, varía en tres entornos: suelo, sistema acuático y compostaje.

La biodegradación se hace más factible en el suelo, ya que existe una gran diversidad de microorganismos. En general, el suelo compostado con bioplástico aumenta la

fertilidad y el rendimiento de cultivos. Se observa que el contenido microbiológico aumenta después de la biodegradación. Por ejemplo, cuando el PLA se biodegrada, libera H<sub>2</sub>O, CO<sub>2</sub> y materia orgánica descompuesta que las plantas son capaces de utilizar. Además, cuando se añade O<sub>2</sub>, no se generan intermedios ni subproductos tóxicos (Ali Shah, et al., 2008). En procesos de compostaje, las películas de PHAs enriquecen el suelo más que las de PLA, ya que aumenta la población microbiana. La biodegradabilidad más alta se encontró para bioplásticos a base de celulosa.

A continuación, se muestra en la Tabla 1 la biodegradación de diferentes bioplásticos tanto en el suelo como en medio acuático (Ahsan et al., 2023).

Tabla 1. Biodegradabilidad de diferentes polímeros.

Bioplástico	Medio	Tª/Humedad/pH	Biodegradabilidad (%)	Días para la biodegradación
PLA	Suelo	30%	10%	98
PLA	Suelo	25°C / 60%	13,80%	28
PLA	agua de mar	25°C	8,40%	365
PHA	Suelo	20°C/60%	48,50%	280
PHA	Suelo	39%/ pH 6,8	75%	80
PHA	Compostaje/suelo	25°C/65%	50%	15
PHAs	agua de mar	25°C	8,50%	365
Celulosa	Suelo	Indefinido	100%	103

### 1.3 Metales en microplásticos derivados de bioplásticos.

La presencia de metales en los microplásticos de materiales bioplásticos puede deberse al proceso de fabricación del propio bioplástico, al emplearse como catalizadores en los procesos de producción de sus biopolímeros, tal como se ha señalado anteriormente.

En la síntesis del poliácido láctico (PLA) los catalizadores metálicos más comunes utilizados para facilitar la polimerización son:

- Catalizadores de estaño: Los compuestos de estaño, como el octoato de estaño(II) (Sn(Oct)<sub>2</sub>) o el cloruro de estaño(II) (SnCl<sub>2</sub>), se utilizan ampliamente como catalizadores en la polimerización del ácido láctico. Estos catalizadores de estaño son eficaces para promover la

apertura del anillo del ácido láctico y la formación de las cadenas poliméricas del PLA (Báez et al., 2011).

- Catalizadores de zinc: Los compuestos de zinc, como el acetato de zinc ( $\text{Zn}(\text{OAc})_2$ ) o el cloruro de zinc ( $\text{ZnCl}_2$ ), también se utilizan en la síntesis del PLA como catalizadores. Estos catalizadores de zinc pueden facilitar la policondensación del ácido láctico y promover la formación de enlaces entre las moléculas de ácido láctico (Hu et al., 2017).

La elección del catalizador metálico dependerá del método de polimerización y de las condiciones experimentales específicas. Además, es necesario optimizar las cantidades y las proporciones de los catalizadores utilizados para obtener un PLA con las propiedades deseadas.

En la síntesis del PHB y PHBv también se emplean catalizadores metálicos, entre los que destacan:

- Catalizadores basados en metales alcalinos o alcalinotérreos: Los catalizadores que contienen metales alcalinos como sodio o potasio, o metales alcalinotérreos como calcio, se usan en la síntesis del PHB y PHBv. Estos catalizadores actúan como iniciadores de la polimerización, facilitando la formación de las cadenas poliméricas (Raj et al., 2022).

Pero también los metales pueden ser incorporados a los MPs de bioplásticos como consecuencia de su co-precipitación o adsorción en su superficie, una vez que han sido liberados al medio ambiente. Los metales adsorbidos en los microplásticos pueden provenir de diversas fuentes, como son la actividad industrial, la minería, la agricultura, la acuicultura y la gestión de residuos, etc. (Liu, et al., 2021; Zhou, J, et al., 2020). Se ha constatado que las actividades de producción industrial, la basura y los lodos de las depuradoras constituyen las principales fuentes de contaminación de los MPs presentes en el medio ambiente. Y se ha encontrado una relación directa entre el grado de contaminación por metales pesados en un suelo y el contenido de ciertos metales, Cd, Pb, Mn y Hg, en los MPs presentes en dicho suelo (Zhou, et al., 2019).

Se ha evaluado el diferente comportamiento de microplásticos de bioplásticos degradables (PCL, PLA) y de un plástico convencional (PE), en relación a su capacidad de adsorción de metales pesados (Cu, Pb, As, Mn, Cr y Co) durante su envejecimiento

en agua de mar. Los autores concluyeron que ambos tipos de microplásticos mostraron diferentes afinidades por los metales, siendo más retenidos el Pb, Cu y As en los biodegradables y el Mn, Cr y Co en el PE. También el PE incrementó su capacidad de adsorción con el tiempo (9-12 meses), mientras que no ocurrió así para los bioplásticos (Shi et al., 2023).

Dependiendo de los metales estudiados, existen estudios que demuestran una mayor capacidad de adsorción de metales del medio al bioplástico, PLA, con respecto a un plástico convencional, PE (Guan et al., 2022). Y otros estudios en los que el mismo bioplástico (PLA) manifestó una menor capacidad de adsorción en comparación con MPs de plásticos convencionales (PE, PVC, PS, PP) (Liao & Yang, 2020). En experimentos de laboratorio se constató que esta capacidad aumentó con el tiempo de exposición y tendió a ser estable después de alcanzar su equilibrio (C. Chen et al., 2021; Q. Chen et al., 2021).

Tal como se ha comentado anteriormente, los MPs pueden alcanzar todos los ecosistemas y entrar en la cadena trófica, por lo que es importante tener en cuenta esta presencia de metales en los bioplásticos y no sólo en los plásticos convencionales. Hoy en día está en continuo aumento el uso estos plásticos alternativos, en sustitución de plásticos convencionales, por lo que es necesario realizar estudios que permitan evaluar su viabilidad como materiales sostenibles tanto medioambientalmente como para la salud humana.

#### 1.4 Bioaccesibilidad y biodisponibilidad de metales presentes en microplásticos.

Uno de los principales destinos ambientales de los residuos plásticos es el medio marino, por lo que los microplásticos primarios o los generados a partir de dichos residuos pueden tener una amplia variedad de efectos en los organismos acuáticos. De esta manera, los metales (y otros contaminantes) presentes en los microplásticos pueden llegar a acumularse en los tejidos de los organismos a lo largo de la cadena alimentaria (Galloway et al., 2017).

Estos efectos no solo son provocados por la ingesta directa de los MPs sino también por la liberación al medio de compuestos tóxicos presentes en los plásticos, quedando potencialmente disponibles en el medio ambiente y bioaccesibles para los seres vivos.

Cuando se estudia el impacto ambiental de estos materiales, desde el punto de vista de la contaminación metálica, es importante diferenciar dos términos directamente relacionados como son la bioaccesibilidad y biodisponibilidad de los metales presentes en los microplásticos. La **bioaccesibilidad** se refiere a la fracción de un metal que se encuentra disponible para su absorción por parte de los organismos vivos que se exponen a los microplásticos en el medio ambiente. Por otro lado, la **biodisponibilidad** se refiere a la capacidad de un metal para ser absorbido y utilizado por los organismos vivos (Gómez-Jacinto et al., 2020).

La biodisponibilidad de los metales en el medio marino puede estar influenciada por factores como la salinidad, el pH, la temperatura y la presencia de otros componentes químicos en el agua (Khan et al., 2022).

Los riesgos a nivel humano de la presencia de metales en MPs ha sido evaluado mediante métodos *in vitro*, que consideran la ingestión de MPs y su posterior digestión gastrointestinal. En este caso, la fracción biodisponible es la fracción metálica que atraviesa la membrana celular del intestino y pasa al torrente sanguíneo. Así, Godoy et al. (2020) estudian la bioaccesibilidad de dos metales pesados (Cr y Pb) presentes en microplásticos en el cuerpo humano, mediante el uso de un simulador gastrointestinal dinámico, el cual es capaz de reproducir las condiciones fisiológicas gastrointestinales humanas. Los resultados obtenidos mostraron comportamientos muy diferentes para cada polímero (PE y PP) y metales estudiados. El Cr se liberó más rápido en el estómago y comenzaba a precipitar con el tiempo, mientras que el Pb se liberó más lentamente y en menor cantidad; comenzó a precipitar cuando el pH aumentaba a 6,5 unidades en la disolución duodenal. Cuando terminó la fase duodenal la cantidad Pb que fue absorbido por la membrana del reactor que simula la absorción intestinal fue mayor que la de Cr.

Con un modelo digestivo similar, se estudió el comportamiento del Cr, As, Cd y Pb en microplásticos de PVC y se observó que el Pb en la disolución gástrica (pH = 1,5) era 100 % bioaccesible. Al aumentar el pH a 7 en la fase intestinal este porcentaje descendió al 14%, por lo que la precipitación del plomo es probablemente la responsable de esta disminución de su bioaccesibilidad. Mientras que la bioaccesibilidad del Cr, As y Cd aumentaron desde la fase gástrica a la intestinal (Chen, X. et al., 2022). Estos datos del Pb son consistentes con otro estudio en el que se ensayaron microplásticos de diferentes tipos y se estudió la bioaccesibilidad del Fe, Mn, Co y Pb; simulando las condiciones gástricas de las aves marinas. Se concluyó que las concentraciones

bioaccesibles eran insuficientes para causar efectos adversos a las aves (Holmes, L, et al., 2020).

## 1.5 Legislación

La legislación sobre plásticos en Europa está en constante evolución para abordar los problemas ambientales relacionados con el plástico y promover prácticas más sostenibles en su producción y uso. Se centra principalmente en la reducción del consumo de bolsas de plástico ligeras (Directiva (UE) 2015/720), la regulación de la migración de sustancias desde materiales plásticos a alimentos (Reglamento (UE) No 10/2011) y la limitación de metales pesados en plásticos utilizados en envases de alimentos (Directiva 94/62/CE). En este último caso se pretende reducir o eliminar la presencia de 32 metales pesados en plásticos utilizados en envases de alimentos, estableciendo que la suma total del contenido en Pb, Cd, Hg y Cr (VI) no puede exceder los 100 mg/kg. En cuanto al límite global de migración, éste no debe superar los 10 mg por 1 dm<sup>2</sup>.

También, la Estrategia Europea de Plásticos (2018) establece un marco general para abordar los desafíos relacionados con los plásticos en la UE, incluyendo objetivos ambiciosos para la economía circular y el reciclaje de plásticos.

En el caso concreto de los microplásticos, la Agencia Europea de Sustancias y Mezclas Químicas (ECHA) propuso en 2019 una restricción sobre su uso en productos comercializados en UE. Se calcula que se podría evitar la liberación de 500 mil toneladas de MPs en un plazo de 20 años (ECHA, 2020).

Con el fin de evaluar el riesgo derivado de la posible ingestión de MPs procedentes del medio marino, se puede tener en cuenta la regulación específica para el contenido metálico en productos de la pesca la ingestión máxima de metales en el medio marino puede variar según el país o región. En la Unión Europea, los límites máximos de metales en los productos pesqueros y mariscos se establecen en el Reglamento (CE) No 1881/2006, actualizado por el Reglamento (UE) No 2019/1881, con objeto de. Los límites máximos se establecen para proteger la salud humana de los posibles efectos tóxicos de la exposición a metales presentes dichos en los productos del mar.



Por ejemplo, el límite máximo para el plomo en pescado y mariscos es de 0,1 mg/kg, mientras que el límite máximo para el mercurio en pescado y mariscos varía según la especie y el país de origen. En España oscila entre (0,5-1,0) mg/kg carne.

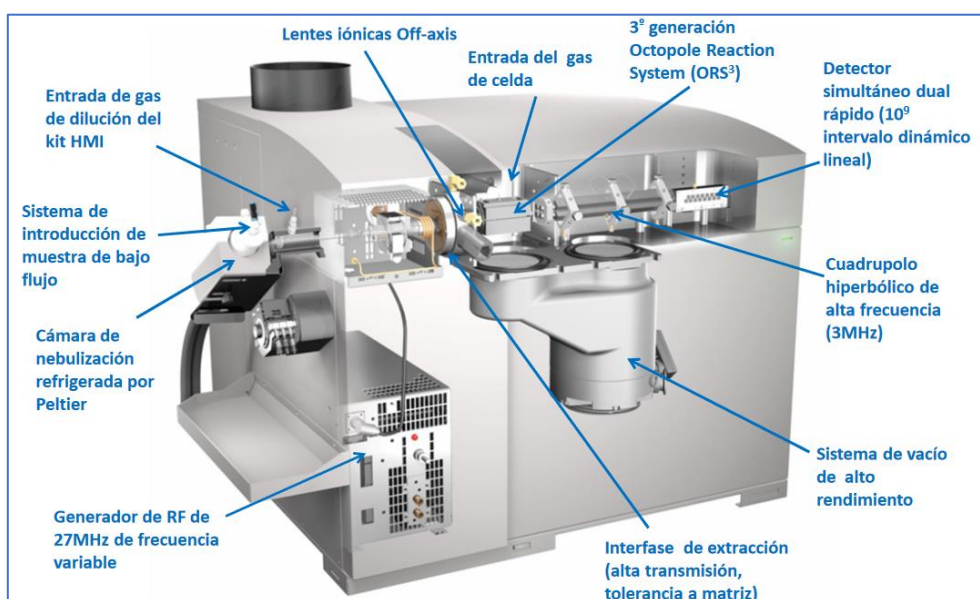
### 1.6 Determinación de metales.

Para la determinación de metales presentes en microplásticos se pueden emplear diversas técnicas instrumentales, entre las que se encuentran la espectroscopía de absorción atómica (AAS), la espectroscopía de emisión óptica (OES), la espectrometría de masas con plasma acoplado inductivamente (ICP-MS) y la espectrometría de fluorescencia de rayos X (XRF).

De todas estas técnicas, destaca el ICP-MS que proporciona información multielemental de manera rápida, precisa y exacta para determinar y cuantificar la mayoría de los elementos de la tabla periódica a niveles traza y ultratrazo, en un amplio rango lineal de 9 órdenes de magnitud (ng/L – mg/L) y con muy bajos límites de detección.

Esta técnica es la empleada en este trabajo final de grado para la determinación de metales en las muestras de MPs de los bioplásticos, objeto de estudio.

Los componentes del sistema se muestran en la Figura 8. Éste consta de un sistema de introducción de muestra, plasma y bobina de radiofrecuencia, interfase, sistema de purga, lente de iones, celda de reacción, espectrómetro de masas y detector.



*Figura 8. Componentes de un instrumento de ICP-MS (Agilent Technologies®)*

Además, combina dos propiedades analíticas que lo convierten en un potente detector en el campo de análisis de trazas. La primera es la obtención de una matriz prácticamente libre de interferencias debido a la alta eficiencia de ionización del plasma de argón y, por otra parte, presenta una alta relación señal-ruido, característico en las técnicas de espectrometría de masas.

La introducción de la muestra se realiza mediante un sistema nebulizador para muestras líquidas, y para muestras sólidas mediante vaporización electrotérmica o ablación láser (Skoog et al., 2007). El sistema de inyección de la muestra líquida consigue la nebulización por efecto Venturi. La muestra entra al dispositivo por medio de una bomba peristáltica y es transportada hasta el sistema nebulizador, donde es transformada en aerosol gracias a la acción del gas argón, el cual se encuentra a temperaturas aproximadamente de (8.000 – 10.000) K. Los iones del plasma de argón y electrones poseen energías cinéticas extremadamente elevadas que ionizan la mayoría de los analitos con una eficiencia de más del 90 %. De este modo, los átomos presentes en la muestra son ionizados, se forman iones elementales monopositivos ( $M^+$ ) que son transferidos a través de un cono de muestreo y luego a un segundo cono denominado separador (Cueto Díaz, 2013).

Después, estos iones monocargados son acelerados y enfocados a través de un sistema óptico, para ser conducidos hacia el orificio de entrada del analizador de masas (generalmente cuadrupolo), donde los iones son separados de acuerdo con su relación masa/carga. Finalmente, éstos alcanzan el detector multiplicador de electrones (Mothes & Mattusch, 2014).

Para la determinación de metales en muestras de microplásticos mediante esta técnica, primero se realiza una digestión ácida de la muestra para poner en disolución los metales presentes en los MPs. Posteriormente, se el extracto obtenido se analiza mediante el ICP-MS (Kutralam-Muniasamy et al., 2021).

En la bibliografía se citan diferentes estudios de cuantificación de metales en microplásticos a través de esta técnica, como el estudio explicado en el apartado 1.3 en el cual llevan a cabo una adsorción metálica sobre los MPs, su digestión y posterior análisis empleando de esta técnica (Shi et al., 2023). Elseblani et al. (2023) utilizan la misma técnica para la cuantificación de diversos metales como el U, Th, V, Pb, Cr, Hg,

Sn Pd, As, Ag en diferentes tipos de microplásticos convencionales, sometidos a una digestión ácida previa. También Hind El Hadri et al. (2020) emplea la técnica para la cuantificación de los metales Fe, Cu, Zn, As, Cd, Sn, Sb, Pb y V en el mismo tipo de matriz polimérica. En todos los estudios se alcanzaron resultados reproducibles y satisfactorios con la técnica de ICP-MS.

## 2. PARTE EXPERIMENTAL

---

### 2.1 Materiales y reactivos

- Reactivos

- Ácido clorhídrico 1M, HCl, (Sigma Aldrich, USA).
- Ácido clorhídrico 36,5 % - 38 %, HCl para análisis de trazas (J.T. Baker).
- Ácido glucurónico (Sigma Aldrich, USA).
- Ácido nítrico 69 % - 70 %, HNO<sub>3</sub>, para análisis de trazas (J.T. Baker).
- Ácido Úrico (Sigma Aldrich, USA).
- Agua ultrapura (UPW) de resistividad de 18 MΩ·cm obtenida mediante el sistema de purificación de agua Direct-Q®, Millipore Co (Bedford, MA, USA).
- Albúmina de suero bovino (Sigma Aldrich, USA).
- Bicarbonato de sodio, NaHCO<sub>3</sub> (PA, Sigma Aldrich, USA).
- Bifosfato de sodio, NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (PANREAC).
- Carbonato de potasio, K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, (Sigma Aldrich, USA).
- Cloruro de amonio, NH<sub>4</sub>Cl (Sigma Aldrich, USA).
- Cloruro de calcio dihidratado, CaCl<sub>2</sub> ·2H<sub>2</sub>O (EMSURE).
- Cloruro de magnesio al 98%, MgCl<sub>2</sub> (Sigma Aldrich, USA).
- Cloruro de potasio, KCl (Sigma Aldrich, USA).
- Cloruro de sodio 99,5%, NaCl (Sigma Aldrich, USA).
- Disoluciones patrón de 1000 mg/L de Cd, Sn, Sb, Hg, Pb, Cr, Mn, Co, Ni, Cu (Panreac, España).
- Fosfato monopotásico, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, (Sigma Aldrich, USA)
- Glucosa (Analar NORMAPUR, BÉLGICA).
- Hidrocloruro de Glucosamina (Sigma Aldrich, USA).
- Hidrógeno fosfato de dipotasio, K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (Sigma Aldrich, USA)
- Hidróxido de sodio, NaOH (EMSURE, ALEMANIA).
- Lipasa (Sigma Aldrich, USA).
- Mucina (Sigma Aldrich, USA).
- Pancreatina, porcina (Sigma Aldrich, USA).
- Pepsina, mucosa gástrica porcina (Sigma Aldrich, USA).
- Sales biliares (Sigma Aldrich, USA).

- Sales de mar, S9883 (Sigma Aldrich, USA).
  - Sulfato de sodio, Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (Sigma Aldrich, USA).
  - Tiocianato de potasio, KSCN (EMPLURA, Sigma Aldrich).
  - Urea (Carbamida), NH<sub>2</sub>CONH<sub>2</sub> (Sigma Aldrich, USA).
  - α-Amilasa, páncreas porcino (Sigma Aldrich, USA)
  - TRIS 99,9%, N-tri(hidroximetil)metilamina, (Sigma Aldrich, USA).
- Material
    - Material volumétrico de vidrio clase A.
    - Espátulas de plástico.
    - Membranas de diálisis, Cellu Sep® H1 high grade regenerated cellulose tubular membranes (molecular weight cutoff 10 kDa, 50 cm x 25.5 mm), Membrane Filtration Products Inc (Seguin, TX, EEUU).
    - Filtros de nylon de 0,22 µm (ThermoScientific, USA) acoplados a jeringas de plástico de 25 mL.
    - Micropipetas Eppendorf de volumen fijo y variable (Hamburgo, Alemania).
    - Botes de plástico para conservar los extractos.

Para evitar la contaminación metálica, todo el material de vidrio y plástico utilizado se lavó con agua ultrapura y se mantuvo en un baño de HNO<sub>3</sub> al 10% durante 48h. Antes de su uso se aclaró al menos tres con agua ultrapura.

## 2.2 Instrumentación

- Balanza electrónica AND modelo ER-180A, de precisión ± 0,0001 g (Thebarton SA, Australia).
- pHmetro, CRISON micropH 2001 (Crison, España).
- Incubador Boxcult y agitador orbital Rotavit (Selecta, España).
- Estufa, modelo P-Selecta (Selecta, España).
- ICP-MS cuadrupolar Thermo X-serie 2 (Waltham, MA, EEUU).
- Microondas ETHOS Plus, provisto con un sistema de 6 reactores de teflón de alta presión (Milestone, Sorisole, Italia).

## 2.3 Preparación de las muestras

En el presente trabajo se emplearon muestras de bioplásticos procedentes de proyectos de investigación desarrollados por el grupo de QANAP. Los bioplásticos son: ácido poliláctico (PLA), poli(3-hidroxi butirato) (PHB) y poli(3-hidroxi butirato-co-3-hidroxi valerato) (PHBv). Todos los materiales vírgenes fueron obtenidos comercialmente en forma de gránulos regulares, con tamaños inferiores a los 5 mm (Figura 9).



*Figura 9. Muestras de bioplásticos analizadas: a) PLA, b) PHB y c) PHBv*

### 2.3.1 Proceso de adsorción metálica

Las muestras descritas se someten a un proceso previo de adsorción de metales, con objeto de simular su comportamiento como vectores de contaminación en el medio marino. Dicho procedimiento consiste en poner en contacto los gránulos de los bioplásticos con un agua de mar sintética sobrecargada con una determinada concentración de los metales objeto de estudio.

Para ello, se prepara una disolución de agua de mar sintética con una concentración de 10 mg/L de los metales objeto de estudio: Cr, Mn, Co, Ni, Cu, Ag, Cd, Sn, Sb, Hg, Pb. Se pesan en balanza analítica 10,0000 g de MPs de cada biopolímero, se introducen en sendos matraces Erlenmeyer y se les añaden 500 mL del agua de mar preparada anteriormente. También se realizó un blanco de procedimiento con el agua de mar sin fortificar.

Los matraces se mantienen en agitación durante 48 h, a temperatura ambiente, en el incubador. Finalmente, se filtra el agua, se recogen los gránulos en cajas Petri y se secan en estufa a 60 °C durante 24 h.

Las muestras de MPs así sobrecargadas con los metales de interés serán analizadas para determinar su concentración metálica total, así como se utilizarán en los ensayos de digestión gástrica *in vitro* para evaluar la bioaccesibilidad y biodisponibilidad metálica.

#### 2.4 Procedimiento de digestión ácida asistida por energía de microondas

Para cuantificar el contenido total de metales en los gránulos de MPs (virgen y sobrecargados) es necesario poner en disolución dichos metales mediante una digestión ácida asistida por energía de microondas.

Para realizar la digestión, se pesan en balanza analítica 0,1000 g de las muestras, se introducen en los reactores de alta presión y se añaden los siguientes reactivos: 8 mL de HNO<sub>3</sub> al 70 % y 2 mL de HCl al 35%. A continuación, se someten al programa de temperaturas que se muestra en la Tabla 2 (optimizado previamente en el grupo de investigación QANAP). Los extractos obtenidos se diluyen a 50 mL en matraces aforados. Se preparan de la misma forma blancos de procedimiento.

Tabla 2. Programa de temperaturas del horno microondas

P (W)	t (min)	T (°C)
1000	0	0
1000	5	120
1000	20	180
1000	35	220
1000	50	220
1000	95	0

Posteriormente las disoluciones se filtran con filtros de jeringa de 0,22 µm, y se conservan a 4 °C hasta el momento de su análisis mediante ICP-MS.

#### 2.5 Procedimiento de digestión gástrica *in vitro*

Se lleva a cabo una simulación del proceso digestivo de los seres humanos. Para ello se prepararon cinco disoluciones que intervienen en este proceso, en el siguiente orden: la primera es la disolución sintética de la saliva (S), luego la disolución sintética gástrica (G), la tercera es la disolución sintética duodenal, la cuarta se trata de la bilis y, por último, la disolución que simula al plasma humano (SBF). En las tablas del Anexo 2 se

recogen los diferentes reactivos que se utilizan para preparar cada una de las disoluciones.

Antes de su utilización, todas las disoluciones se activan en el incubador durante 1 hora a 37 °C.

Se pesaron 0,6000 g del polímero en tubos de centrifuga de vidrio de 50 mL. Después, se añaden 9 mL de saliva y se agita manualmente durante 10 segundos. Posteriormente, se añaden 13,5 mL de fluido gástrico y se agita durante 1h a 37 °C en un incubador. Luego, se añadieron 27mL de la disolución duodenal (se comprueba que el pH sea inferior a 1,5) y a continuación se añaden 9 mL de bilis (pH = 6,3 + 0,5).

Los ajustes de pH se realizaron con disoluciones de NaOH 1 M y de HCl al 37 %.

A continuación, se introducen 20 mL de la disolución de plasma en la membrana, que ha sido previamente acondicionada hidratándolas con abundante agua ultrapura. Se pesa y se introduce en el matraz. Se mantiene en el incubador durante 4 h a 37 °C.

Después de este tiempo, se retira la membrana y se recogen las dos fracciones finales: la interna de la membrana (que se designa de aquí en adelante como fracción dializada, D) y la externa a la membrana (llamada fracción no dializada, ND). Ambas fracciones se trasvasan a botes de plástico limpios y se conservan a -4 °C hasta el momento de su análisis mediante ICP-MS.

De todas las fracciones obtenidas se determinan sus masas, que se calculan por diferencia. Estos ensayos se realizan por triplicado y también se preparan los correspondientes blancos de procedimiento, en ausencia de MPs.

## 2.6 Determinación de metales mediante espectroscopía de masas con plasma acoplado inductivamente (ICP-MS)

En este trabajo de fin de grado son objeto de estudio los siguientes elementos: Cd, Co, Cr, Cu, Hg, Mn, Ni, Pb, Sb y Sn.

### 2.6.1 Condiciones instrumentales

La determinación de los elementos metálicos se realiza empleando un equipo de ICP-MS. Para ajustar sus parámetros instrumentales se utiliza una disolución multipatrón lo que permite medir las masas bajas, medias y altas de los metales de interés con la máxima sensibilidad y minimizar el efecto de las interferencias poliatómicas. El número



de cuentas de cada uno de los metales y el porcentaje máximo de interferentes viene indicado por el fabricante.

Las condiciones instrumentales fijadas en el equipo empleado se detallan en la tabla 3.

Tabla 3. Condiciones Instrumentales del equipo de ICP-MS

<b>Condiciones de operación</b>	
Potencia	1,35 kW
Flujo de gas del nebulizador	0,75 L min <sup>-1</sup>
Flujo de gas de refrigeración	1,00 L min <sup>-1</sup>
Flujo de gas de muestra	14,00 L min <sup>-1</sup>
Flujo del nebulizador	1 mL min <sup>-1</sup>
Cámara de nebulización	Scott de doble paso, refrigerada a 4 °C
<b>Parámetros de adquisición</b>	
Modo de adquisición	Scan
Modo de detección	Dual
Tiempo de medida	3 s / isótopo

Los isótopos de cada elemento elegidos para su determinación son: <sup>111</sup>Cd, <sup>59</sup>Co, <sup>52</sup>Cr, <sup>63</sup>Cu, <sup>55</sup>Mn, <sup>60</sup>Ni, <sup>208</sup>Pb, <sup>121</sup>Sb y <sup>118</sup>Sn, <sup>56</sup>Fe, <sup>109</sup>Ag. Para los metales Cd, Fe, Co, Ag, Sn, Sb, Pb se empleó como patrón interno el <sup>113</sup>Rh y para los metales Cr, Mn y Cu se utilizó el <sup>45</sup>Sc.

### 2.6.2 Linealidad

- a) Determinación del contenido total de metales en microplásticos.

La digestión ácida de los MPs proporcionó su disolución total, obteniendo extractos incoloros. Para la cuantificación de los metales en dichos extractos se emplea el método de cuantificación con disoluciones multipatrón en medio ácido (10 % v/v HNO<sub>3</sub>).

A modo de ejemplo se muestra en la Figura 10 la representación gráfica de la recta de calibrado correspondiente al Mn.

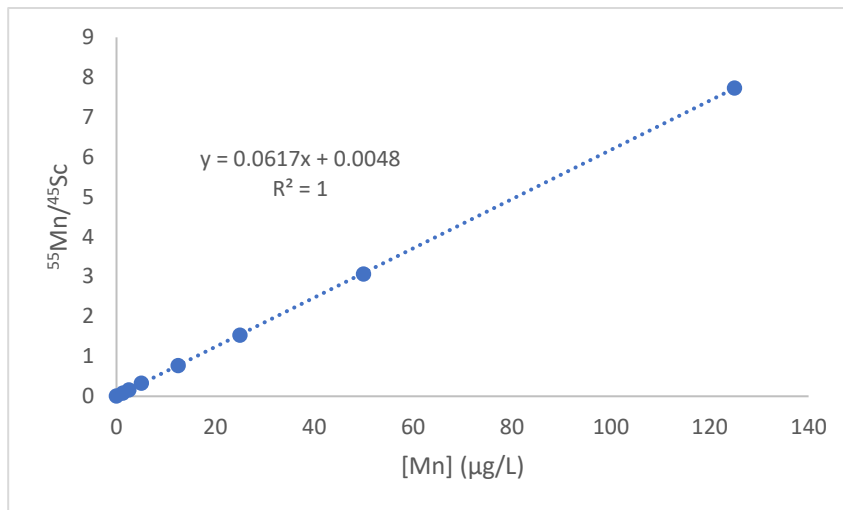


Figura 10. Recta de Calibrado para la determinación del contenido total de Mn en los microplásticos.

Se construyen las rectas para los demás metales (Anexo 2). Los valores obtenidos del coeficiente de correlación ( $r$ ) para todos los metales objeto de estudio son del orden de 0,9900; por lo que la relación se puede considerar lineal en el rango de concentraciones estudiadas en cada caso.

b) Determinación de metales en las disoluciones obtenidas en la digestión *in vitro*.

Para evaluar cuál es el método de cuantificación adecuado para la determinación de metales en MPs en las disoluciones obtenidas en los ensayos de *digestión in vitro*, se comprobó el efecto de la matriz, comparando las pendientes de las rectas de calibrado al 1 % de HNO<sub>3</sub> con las correspondientes rectas de adición para las fracciones de no dializado (ND) y dializado (D).

Las rectas de calibrado y de las correspondientes adiciones obtenidas para la determinación del Mn se muestran en la Figura 11.

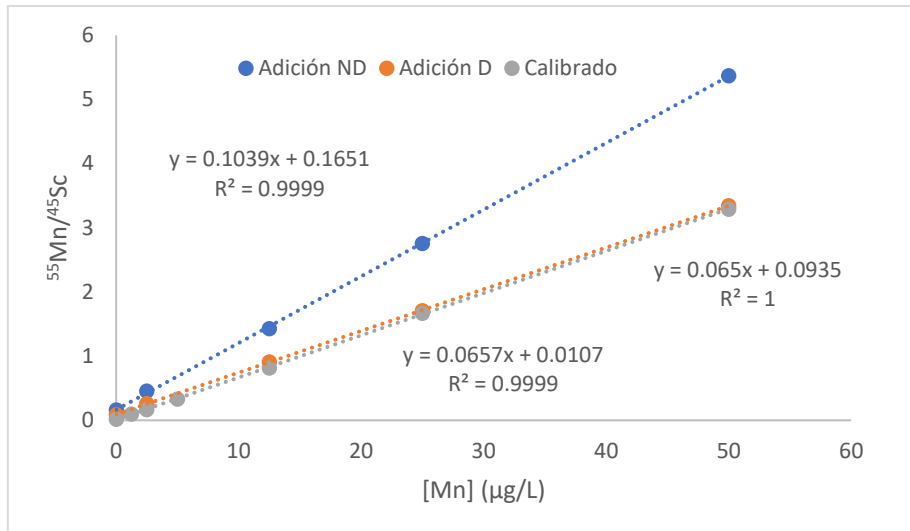


Figura 11. Rectas de calibrado y adiciones para el Mn en las fracciones no dializado y dializado.

Para ello, se compararon las pendientes de las rectas de calibrado con las rectas de las adiciones. Antes de realizar el Test t para comparar las pendientes, es necesario realizar el Test F, donde se comparan los cuadrados de los errores asociados a cada recta ( $S_{y/x}^2$ ), utilizando la ecuación 1:

$$F = \frac{S_{y/x1}^2}{S_{y/x2}^2} \quad \text{Ecuación 1}$$

La F experimental calculada para la recta de calibrado y la adición de no dializado fue de 0,21. En el caso de la comparación de la recta de calibrado y la adición del dializado fue de 2,15. En ambos casos,  $F_{exp} < F_{crit} (9,013)$ , por lo que las varianzas son comparables y podemos calcular t mediante el Test de Student, mediante la ecuación 2:

$$t_{exp} = \frac{b_1 - b_2}{\sqrt{\frac{S_x^2}{y} \cdot \left( \frac{1}{\sum(x_{i,1} - x_1)} + \frac{1}{\sum(x_{i,2} - x_2)} \right)}} \quad \text{Ecuación 2}$$

Estos cálculos se realizan para cada uno de los elementos objeto de estudio y se obtiene que para todos ellos los valores de 't' experimentales son mayores que los valores de 't' crítica, por lo que las pendientes no son comparables. Esto hace necesario seleccionar el método de las adiciones estándar para cuantificar todos los elementos, tanto en las disoluciones de dializado como de no dializado.

### 2.6.3 Límites de detección y cuantificación

Se evaluó la sensibilidad a través de los parámetros: límite de detección (LDD) y límite de cuantificación (LDC)

- El LDD se define como el valor mínimo de la magnitud a medir que el instrumento puede diferenciar de forma fiable de un ruido instrumental o un blanco, al 99% de confianza.

La ecuación del LDD del calibrado es:

$$LOD = \frac{a + 3 \cdot Sa}{b} \quad \text{Ecuación 3}$$

Siendo 'a' la ordenada en el origen, 'Sa' el error asociado a la ordenada en el origen y 'b' la pendiente.

La ecuación para el LDD de las adiciones es:

$$LOD = \frac{(a - S_1) + 3 \cdot Sa}{b} \quad \text{Ecuación 4}$$

Donde 'S<sub>1</sub>' es la señal del punto de adición 0.

- El LDQ se define como el valor mínimo de la magnitud a medir que genera una señal que se puede cuantificar de forma fiable, al 99% de confianza.

La ecuación para el calibrado es:

$$LDQ = \frac{a + 10 \cdot Sa}{b} \quad \text{Ecuación 5}$$

La ecuación para las adiciones es:

$$LDQ = \frac{(a - S_1) + 10 \cdot Sa}{b} \quad \text{Ecuación 6}$$

- Resultados de los LDD y LDQ de los contenidos totales en los microplásticos.

En la Tabla 4 se recogen los límites de detección y cuantificación alcanzados para la determinación del contenido metálico total, para el método de digestión ácida asistida por energía de microondas y medida instrumental con ICP-MS.

Tabla 4. LDD y LDQ para la determinación del contenido metálico total.

Metal	LDD ( $\mu\text{g/L}$ )	LDC ( $\mu\text{g/L}$ )
Cd	0,26	0,59
Cr	0,03	0,12
Mn	0,35	1,13
Co	0,12	0,32
Ni	0,89	1,83
Cu	0,83	1,79
Ag	0,80	1,51
Sn	1,11	2,81
Sb	0,08	0,18
Pb	0,23	0,68

- Resultados de los LDD y LDQ de las disoluciones de los ensayos de biodisponibilidad.

Se calculan los límites de detección y cuantificación para la determinación de los elementos estudiados, empleando el método de adición estándar, encada una de las fracciones obtenidas en el proceso de digestión *in vitro*, fracción no dializada (ND) y dializada (D). Se recogen en la Tabla 5.

Tabla 5. Límites de detección (LDD) y de cuantificación (LDC) para la determinación metálica en las fracciones ND y D.

Metal	No Dializado		Dializado	
	LDD	LDC	LDD	LDC
Cd	0,26	0,62	0,07	0,25
Cr	0,07	0,17	0,04	0,13
Mn	0,50	1,64	0,36	0,93
Co	0,49	1,21	0,17	1,49
Ni	1,55	3,71	0,19	0,54
Cu	0,98	2,39	0,14	0,34
Ag	0,04	0,22	0,04	0,36
Sn	0,19	0,46	0,21	0,56
Sb	0,27	0,71	0,04	0,18
Pb	0,22	0,82	0,24	0,76

Los límites de cuantificación obtenidos, tanto para la determinación del contenido total de metales como para el contenido metálico en las fracciones obtenidas en los ensayos de la digestión *in vitro*, permiten la cuantificación de los metales en las disoluciones analizadas.

#### 2.6.4 Precisión.

Los ensayos de digestión *in vitro* se realizaron por triplicado empleando los MPs sometidos al proceso previo de adsorción metálica. Las muestras así sobrecargadas se sometieron a un proceso de digestión ácida para determinar su concentración metálica total, también por triplicado, y se obtuvo una amplia variabilidad en las réplicas de cada muestra. Esto es debido a que el proceso de adsorción no se produce de manera uniforme en todo el material puesto en contacto con la disolución de agua de mar sobrecargada.

Todo ello hace que se alcancen, igualmente, valores altos de desviaciones estándar relativas para las réplicas de las fracciones no dializadas y dializadas, sobre todo para elementos como Mn, Co, Ni, Sn y Pb (30-60 %). Para el resto de los metales oscilan entre el 10 % y 20 %.

### 3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

---

#### 3.1 Ensayos de adsorción metálica.

Para el estudio de la adsorción metálica en los bioplásticos ensayados, se comparan los contenidos en el material virgen y después del proceso de adsorción descrito en el apartado 2.3.1. En la Figura 12 se muestran las concentraciones de los metales obtenidas para el biopolímero PLA, tanto virgen (PLA) como después del proceso de adsorción (PLA<sup>+</sup>).

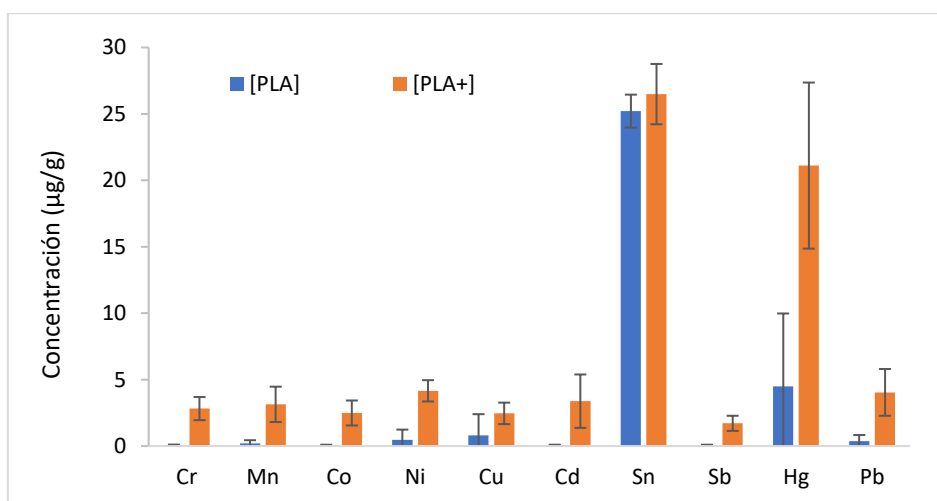


Figura 12. Concentración de los metales estudiados en el PLA virgen (PLA) y sobrecargado (PLA<sup>+</sup>).

Para el PLA virgen, los metales Cr, Mn, Co, Ni, Cu, Cd, Sb y Pb se encuentran en bajas concentraciones (< 1 µg/g). Para el Hg se alcanza una concentración en torno a 5 µg/g mientras que para el Sn se obtiene una alta concentración, de 25 µg/g.

Cuando este plástico se somete a una adsorción simulada en el laboratorio (en agua de mar), se incrementan los contenidos de todos los metales aproximadamente en un factor de 5, excepto para el Sn que no es significativo. En el caso del Hg, se alcanzan contenidos de 20 µg/g.

En la Figura 13 se muestran las concentraciones de los metales estudiados en el PHB virgen y después del proceso de adsorción o sobrecargado (PHB<sup>+</sup>).

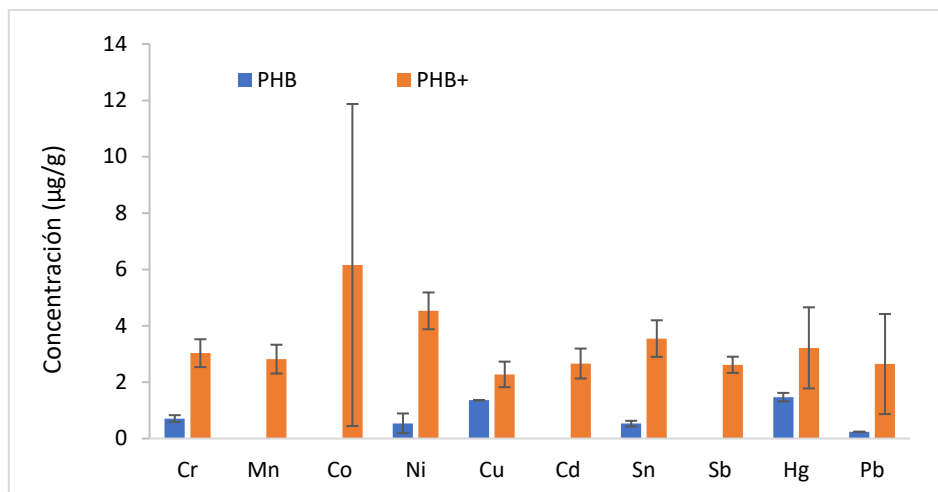


Figura 13. Concentración de los metales estudiados en el PHB virgen (PHB) y sobrecargado (PHB+).

Se observa que en el PHB virgen, no se llegan a cuantificar elementos como Mn, Co, Cd y Sb. Los contenidos para Cr, Ni, Sn y Pb son bajos, del orden de (0,24 – 0,71) µg/g de plástico. Mientras que presenta un contenido algo superior para el Cu y el Hg (1,36 y 1,47) µg/g respectivamente.

Después de someterlo a la adsorción, se observa que se incrementan los contenidos de todos los metales por lo que se confirma la capacidad de retención de los MPs de este bioplástico de todos los metales ensayados.

Por último, en la Figura 14 se muestran las concentraciones de los metales estudiados en el PHBv virgen y después del proceso de adsorción (PHBv<sup>+</sup>).



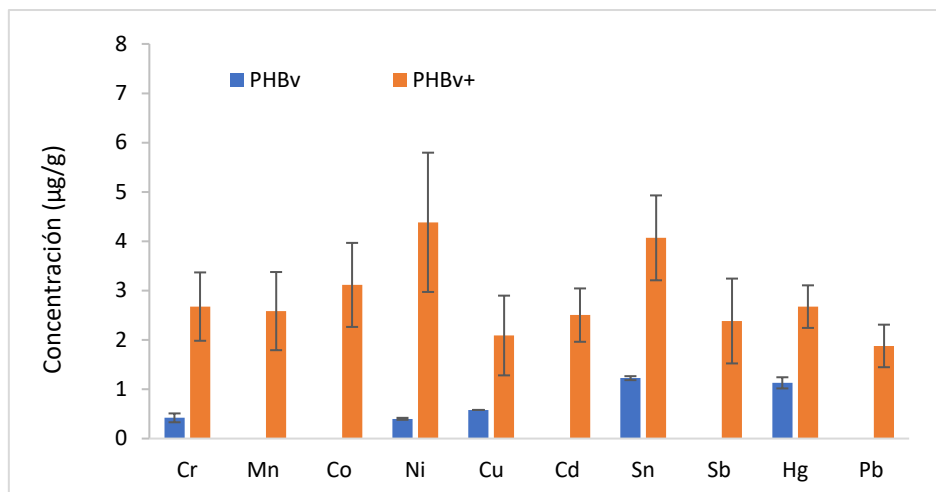


Figura 14. Concentración de los metales estudiados en el PHBv virgen (PHBv) y sobrecargado (PHBv+).

De los resultados alcanzados para el PHBv virgen no se llegó a determinar la presencia de Mn, Co, Cd, Sb y Pb. Los contenidos para Cr, Ni y Cu son bajos, del orden de (0,40 - 0,58) µg/g. Mientras que presenta un contenido algo superior para el Sn y el Hg (1,23 y 1,13) µg/g, respectivamente.

Después de someterlo a la adsorción se observa un incremento de la concentración de todos los metales estudiados de manera variable, con incrementos del doble hasta en un factor de 10.

De los resultados alcanzados en los ensayos de adsorción metálica se confirma que los MPs de los bioplásticos estudiados son capaces de adsorber cantidades significativas de metales presentes en el medio con el que están en contacto, en este estudio medio marino simulado en el laboratorio. Por lo que pueden actuar como vectores de contaminación metálica, ser incorporados en la cadena trófica y poder suponer un riesgo para la salud humana, si son ingeridos.

Con los bioplásticos sobrecargados de esta manera, se llevan a cabo los siguientes ensayos de bioaccesibilidad/biodisponibilidad metálica para el ser humano.

### 3.2 Ensayos de digestión humana *in vitro* .

Los ensayos de digestión humana *in vitro* dan como resultado dos fracciones finales, una de ellas es la que no ha atravesado la membrana que simula la pared intestinal y se ha denominado en este trabajo como fracción “no dializada-ND”. Y es la fracción no biodisponible para nuestro organismo. La otra fracción es la que atraviese la membrana,

“dializada-D”, y en ella se encuentra la fracción metálica que podrá entrar en el torrente sanguíneo y causar efectos nocivos para la salud. Ésta es la **fracción biodisponible** mientras que la **fracción bioaccesible** es la suma de la fracción “no dializada” y “dializada”.

En la Figura 15 se representa el porcentaje de cada metal en las fracciones bioaccesible y biodisponible, calculadas con respecto a la concentración inicial del PLA sobrecargado (PLA+).

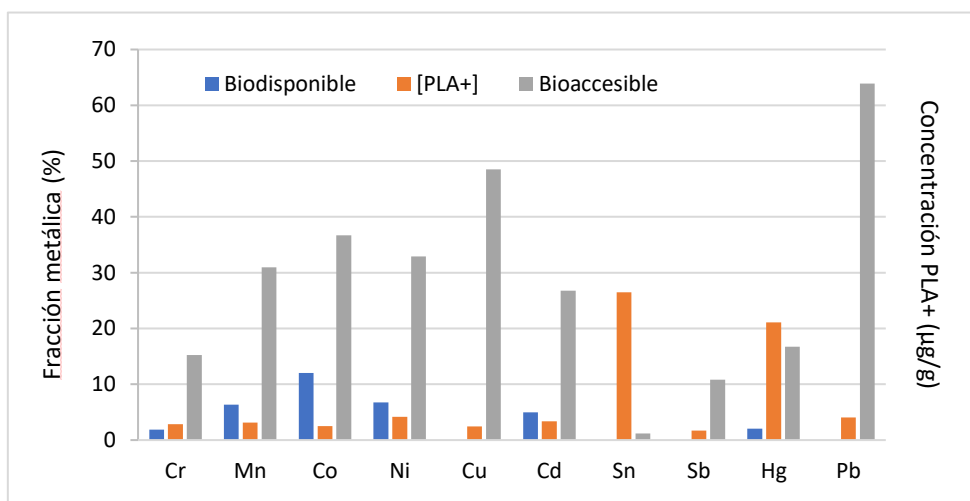


Figura 15. Porcentaje metálico en las fracciones bioaccesible y biodisponible, y contenido metálico total en el PLA+.

Se observa que todos los metales son bioaccesibles, si bien el Sn es muy bajo porcentaje (1,20 %). El Sb, Hg y Cr se encuentran en porcentajes intermedios (10 - 20 %). El Mn, Co, Ni y Cd en valores más altos (30-40%), siendo los más bioaccesibles el Cu y el Pb (48 % y 63 %, respectivamente).

En cuanto a la biodisponibilidad, no se pudieron cuantificar Cu, Sn, Sb y Pb en esta fracción. El Cr y el Hg presentaron un bajo porcentaje, del orden del 2 %, el Cd, Ni y Mn del 5 % y el Co mostró el valor más alto, con un 12 %.

Para PHB+, se muestran en la Figura 16 los resultados obtenidos.

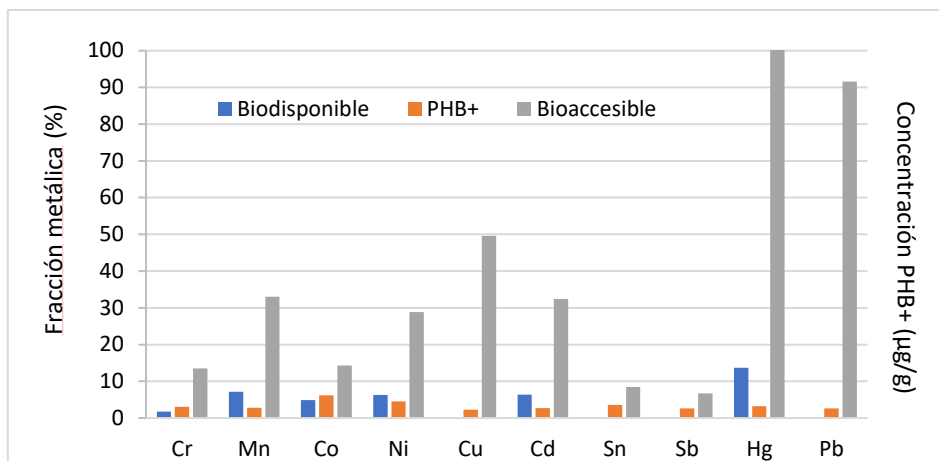


Figura 16. Porcentaje metálico en las fracciones bioaccesible y biodisponible, y contenido metálico total en el PHB+ .

Se observa que todos los metales son bioaccesibles. El Sb y el Sn son los que tienen menor porcentaje, 7 %. El Cr, Co, Ni, Mn, Cd y Cu se encuentran en porcentajes intermedios (10-50 %). Siendo los más bioaccesibles el Pb y el Hg (casi del 100%).

Al igual que en PLA+ todos los metales, menos el Cu, Sn, Sb y Pb, son biodisponibles. El Cr en un bajo porcentaje (2 %), algo superiores para Co, Ni, Cd y Mn (4-8 %). Siendo el Hg el más biodisponible para este bioplástico, con un 14%.

En el caso del PHBv+ (Figura 17) se observa que todos los metales son bioaccesibles. El Sb y el Sn es el que tiene menor porcentaje (7 %). El Cr, Co, Ni, Cd, Mn y Cu mostraron porcentajes intermedios (10-60 %). Toda la fracción metálica del Pb y Hg es bioaccesible.

Al igual que en los anteriores bioplásticos, no se pudieron cuantificar en la fracción biodisponible Cu, Sn, Sb y Pb. El Cr presenta un bajo porcentaje (3%), Co, Ni, Cd y Mn intermedios (10-20 %) y el Hg muestra la mayor biodisponibilidad (30 %).

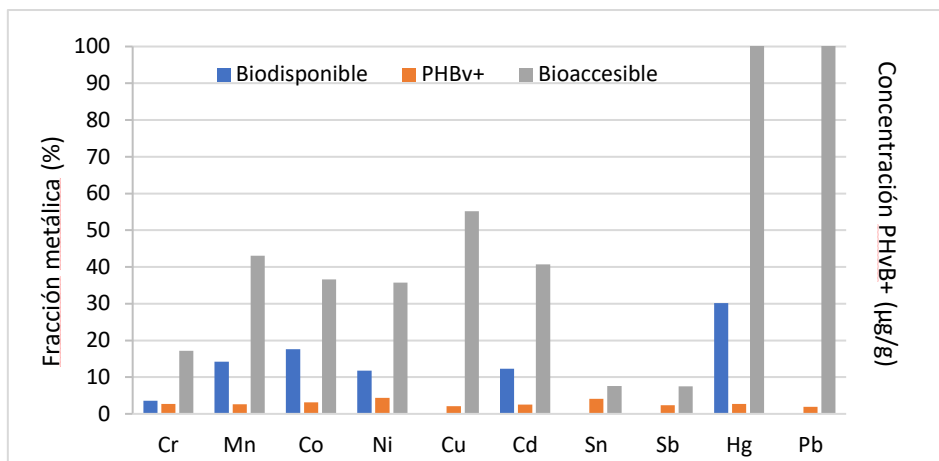


Figura 17. Porcentaje metálico en las fracciones bioaccesible y biodisponible, y contenido metálico total en el PHBV+

Para finalizar, en la Figura 18 se compara la biodisponibilidad de los metales estudiados para los tres bioplásticos. En todos ellos, el Cu, Sn, Sb y Pb no fueron cuantificados en esta fracción.

Para los demás metales se obtienen porcentajes de biodisponibilidad inferiores al 18 %, excepto el Hg que alcanza el 30 % en el PHBV+. Siendo, en general, este material el que presenta los valores más altos de biodisponibilidad.

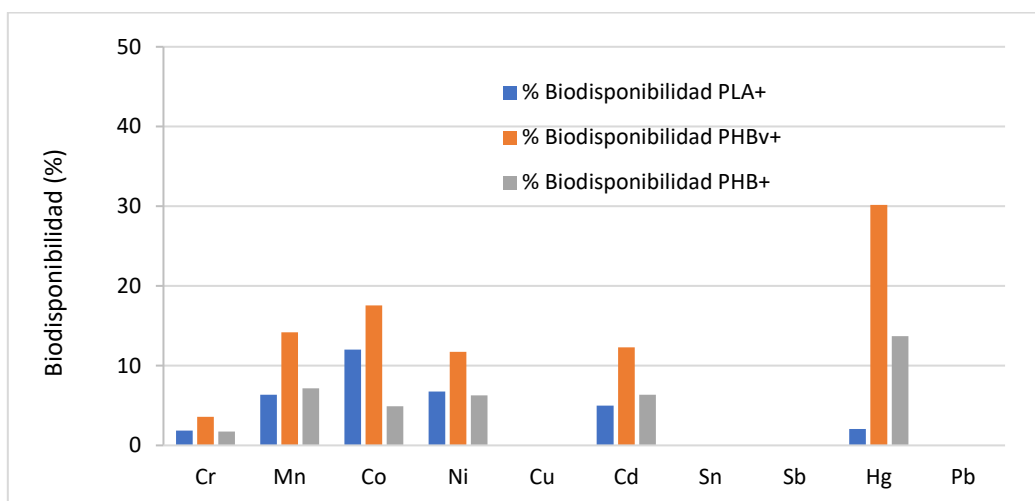


Figura 18. Biodisponibilidad (%) de los metales para los bioplásticos ensayados.

En la bibliografía consultada sólo se ha encontrado un trabajo que realice el estudio de la biodisponibilidad de metales (Cr y Pb) presentes en microplásticos de plásticos convencionales (PE y PP), que también fueron sometidos a un proceso previo de adsorción metálica (1000 mg/L, 48 h). Utilizando una membrana de óxido de aluminio estos autores obtienen porcentajes de bioaccesibilidad entre 24 y 30 %, y porcentajes de biodisponibilidad del 23 %. Estos valores son superiores a los obtenidos en el presente trabajo para Cr y Pb, no pudiendo establecer una clara comparación entre ambos resultados por tratarse de diferentes polímeros tratados en condiciones también distintas (Godoy et al, 2020).

Con respecto a estudios de bioaccesibilidad, Liao et al. (2020) utilizan un procedimiento de digestión gástrica similar al del presente trabajo, para evaluar el comportamiento del Cr en MPs de PLA y de otros polímeros convencionales (sometidos también a proceso de adsorción previo). Obtienen un porcentaje de bioaccesibilidad ligeramente inferior (4 %) al obtenido en este trabajo (15 %).

Por su parte, Wang Li et al. (2022) expresan los resultados alcanzados para Pb y Cd en PP y PS con procedimientos similares como velocidades de liberación del metal, por lo que no se pueden comparar con los resultados de este trabajo.

Chen et al. (2022) obtienen porcentajes de bioaccesibilidad para Cr de 6.9 %, para Cd de 3.5 % y para Pb de 6.0 % a partir de microplásticos de PVC. En el presente TFG se alcanzan valores similares para el Cr, pero muy superiores para el Cd y Pb en los bioplásticos estudiados.

## 4. CONCLUSIONES

---

Las principales conclusiones que derivan de este trabajo son las siguientes:

- Los bioplásticos vírgenes de PLA, PHB y PHBv presentan en su composición contenidos metálicos inferiores a 5 µg/g de la mayoría de los metales estudiados, destacando el contenido de Sn en el PLA (25 µg/g).
- Todos los metales ensayados se retienen en los microplásticos, de los bioplásticos ensayados, en concentraciones de 2 a 10 veces superiores a las iniciales.
- Todos los metales presentes en los MPs analizados son bioaccesibles, en mayor o menor medida. En cuanto a la biodisponibilidad, Cu, Sn, Sb y Pb no se cuantificaron en esta fracción. Para los demás metales, se alcanzaron porcentajes entre el 2 % y 15 %, excepto para el Hg en el PHBv con un 30 %. Señalar que, a pesar del alto contenido de Sn en el PLA, este metal no está presente en la fracción biodisponible.

Por todo lo expuesto, se pone de manifiesto la capacidad de los MPs de bioplásticos de adsorber metales del medio marino, así como de poder liberarlos en el proceso digestivo humano, si bien la mayor parte es bioaccesible pero no biodisponible. No obstante, es necesario continuar con investigaciones que permitan evaluar su viabilidad como materiales sostenibles tanto medioambientalmente como para la salud humana.

### CONCLUSIÓNS

As principais conclusións que se derivan deste traballo son as seguintes:

- Os bioplásticos vírxenes de PLA, PHB e PHBv presentan na súa composición contidos metálicos inferiores a 5 µg/g da maioría dos metais estudados, destacando o contido de Sn no PLA (25 µg/g).
- Todos os metais ensaiados retéñense nos microplásticos, dos bioplásticos ensaiados, en concentracións de 2 a 10 veces superiores ás iniciais.
- Todos os metais presentes nos MPs analizados son bioaccesibles, en maior ou menor medida. En canto á biodispoñibilidade, Cu, Sn, Sb e Pb non se cuantificaron nesta fracción. Para os demais metais, alcanzáronse porcentaxes

entre o 2 % e o 15 %, excepto para o Hg no PHBv con un 30 %. Sinalar que, a pesar do alto contido de Sn no PLA, este metal non está presente na fracción biodispoñible.

Por todo o exposto, pónese de manifesto a capacidade dos MPs de bioplásticos de adsorber metais do medio mariño, así como de poder liberalos no proceso dixestivo humano, aínda que a maior parte é bioaccesible pero non biodispoñible. Non obstante, é necesario continuar con investigacións que permitan avaliar a súa viabilidade como materiais sostibles tanto medioambientalmente como para a saúde humana.

## **CONCLUSIONS**

The main conclusions derived from this work are as follows:

- Virgin bioplastics of PLA, PHB, and PHBv have metallic contents in their composition lower than 5 µg/g for most of the metals studied, with Sn content in PLA standing out at 25 µg/g.
- All the tested metals are retained in the microplastics, from the tested bioplastics, at concentrations 2 to 10 times higher than the initial ones
- All the metals present in the analyzed MPs are bioaccessible, to a greater or lesser extent. Regarding biodisponibility, Cu, Sn, Sb, and Pb were not quantified in this fraction. For the other metals, percentages between 2 % and 15 % were reached, except for Hg in PHBv, which reached 30 %. It should be noted that, despite the high Sn content in PLA, this metal is not present in the biodisponible fraction.

In summary, it is evident that bioplastic MPs have the capacity to adsorb metals from the marine environment, as well as to release them in the human digestive process, although most of them are bioaccesible but not biodisponible. However, further research is needed to evaluate their viability as sustainable materials, both environmentally and for human health.

## BIBLIOGRAFÍA

---

- Ahmad, M., N.P. Nirmal, M. Danish, J. Chuprom, and S. Jafarzedeh. Characterisation of composite films fabricated from collagen/chitosan and collagen/soy protein isolate for food packaging applications. *Rsc Advances*, 2016, 6(85), p. 82191- 82204. <https://doi.org/10.1039/C6RA13043G>
- Ahsan, W.A.; Hussain, A.; Lin, C.; Nguyen, M.K. Biodegradation of Different Types of Bioplastics through Composting—A Recent Trend in Green Recycling. *Catalysts* 2023, 13, 294. <https://doi.org/10.3390/catal13020294>
- Andreeßen and A. Steinbüchel. Recent developments in non-biodegradable biopolymers: Precursors, production processes, and future perspectives. *Applied microbiology and biotechnology*, 2019, 103(1), p. 143-157. <https://doi.org/10.1007/s00253-018-9483-6>
- Báez, J.E., Á. Marcos-Fernández, P. Galindo-Iranzo, (2011). Exploring the Effect of Alkyl End Group on Poly(L-Lactide) Oligo-esters. Synthesis and characterisation. *J. Polym. Res.* 18(5). 1137–1146. <https://doi.org/10.1007/s10965-010-9517-y>
- Chen, C.C., Zhu, X., Xu, H., Chen, F., Ma, J., Pan, K., 2021a. Copper adsorption to microplastics and natural particles in seawater: a comparison of kinetics, isotherms, and bioavailability. *Environ. Sci. Technol.* 55 (20), 13923–13931. <https://doi.org/10.1021/acs.est.1c04278>
- Chen, Q., Wang, Q., Zhang, C., Zhang, J., Dong, Z., Xu, Q., 2021b. Aging simulation of thin-film plastics in different environments to examine the formation of microplastic. *Water Res.* 202, 117462 <https://doi.org/10.1016/j.watres.2021.117462>
- Chen, X., Ma, J., Yu, R., Hu, G., & Yan, Y. (2022). Bioaccessibility of microplastic-associated heavy metals using an in vitro digestion model and its implications for human health risk assessment. *Environmental Science and Pollution Research*. <https://doi.org/10.1007/s11356-022-20983-8>
- Chia, R. W., Lee, J.-Y., Kim, H., & Jang, J. (2021). Microplastic pollution in soil and groundwater: a review. *Environmental Chemistry Letters*, 19, 4211-4224. <https://doi.org/10.1007/s10311-021-01297-6>
- Cueto, S. Desarrollo de metodologías de cuantificación de compuestos orgánicos basados en dilución isotópica en línea de carbono-13 y espectrometría de masas. Tesis (Doctorado en Análisis Químico, Bioquímico y Estructural Avanzado). Oviedo, España, Universidad de Oviedo, 2013, 8 p. <http://hdl.handle.net/10651/22257>



- Dai, Y, Z. Yuan, K. Jack, and J. Keller. Production of targeted poly (3- hydroxyalkanoates) copolymers by glycogen accumulating organisms using acetate as sole carbon source. *Journal of Biotechnology*, 2007, 129(3), p. 489-497. <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2007.01.036>
- Dutta, P.K., J. Dutta, and V. Tripathi. Chitin and chitosan: Chemistry, properties and applications. *Journal of Scientific & Industrial Research*, 2004, 63, p. 20-31. <http://nopr.niscpr.res.in/handle/123456789/5397>
- ECHA. (2020). Questions and Answers on the Restriction Proposal on Intentionally Added Microplastics. December, 0–48.
- El Hadri, H., Gigault, J., Mounicou, S., Grassl, B., & Reynaud, S. (2020). Trace element distribution in marine microplastics using laser ablation-ICP-MS. *Marine Pollution Bulletin*, 160, 111716. <https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2020.111716>.
- Elseblani, Rim, Cobo-Golpe, M., Godin, S., Jimenez-Lamana, J., Fakhri, M., Rodríguez, I., & Szpunar, J. (2023). Study of metal and organic contaminants transported by microplastics in the Lebanese coastal environment using ICP MS, GC-MS, and LC-MS. *Science of The Total Environment*, 887, 164111. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2023.164111>.
- European-Bioplastics. Bioplastics market development update 2021. 2021. [Consulta: 12 de abril de 2022]; Disponible en <https://www.europeanbioplastics.org/market/>.
- Garrido, T., J. Uranga, P. Guerrero, and K.d.l. Caba. The potential of vegetal and animal proteins to develop more sustainable food packaging, in *Polymers for Food Applications*. 2018, Springer, p. 25-59. <https://doi.org/10.1007/978-3-319-94625-2>
- Groot, W., J. Van Krieken, O. Sliemers, and S. De Vos. Production and purification of lactic acid and lactide, in *Poly (Lactic Acid) Synthesis, Structures, Properties, Processing, Applications, and End of Life*. 2022, p. 3-18.
- Galloway, T.S., Cole, M., & Lewis, C. (2017). Interactions of microplastics throughout the marine ecosystem. *Nature Ecology and Evolution*, 1, 0116. <https://doi.org/10.1038/s41559-017-0116>
- Gewert, B., Plassmann, M. M., & MacLeod, M. (2015). Pathways for degradation of plastic polymers floating in the marine environment. *Environmental science: processes & impacts*, 17(9), 1513-1521. <https://doi.org/10.1039/c5em00207a>
- Godoy, V., Martínez-Férez, A., Martín-Lara, M. Á., Vellido-Pérez, J. A., Calero, M., & Blázquez, G. (2020). Microplastics as vectors of chromium and lead during dynamic simulation of

the human gastrointestinal tract. *Sustainability (Switzerland)*, 12(11) Article 4792.  
<https://doi.org/10.3390/su1211479>

Gómez-Jacinto, V., Navarro-Roldán, F., Garbayo-Nores, I., Vílchez-Lobato, C., Borrego, A. A., & García-Barrera, T. (2020). In vitro selenium bioaccessibility combined with in vivo bioavailability and bioactivity in Se-enriched microalga (*Chlorella sorokiniana*) to be used as functional food. *Journal of Functional Foods*, 66, Article 103817.  
<https://doi.org/10.1016/j.jff.2020.103817>

Guan, Y., Gong, J., Song, B., Li, J., Fang, S., Tang, S., Cao, W., Li, Y., Chen, Z., Ye, J., Cai, Z., 2022. The effect of UV exposure on conventional and degradable microplastics adsorption for Pb (II) in sediment. *Chemosphere* 286, 131777.  
<https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2021.131777>

Holmes, L. A., Thompson, R. C., & Turner, A. (2020). In vitro avian bioaccessibility of metals adsorbed to microplastic pellets. *Environmental Pollution*, 261, 114107.  
<https://doi.org/10.1016/j.envpol.2020.114107>

Hu, Y., Daoud, W. A., Fei, B., Chen, L., Kwan, T. H., & Lin, C. S. K. (2017). Efficient ZnO aqueous nanoparticle catalysed lactide synthesis for poly(lactic acid) fibre production from food waste. *Journal of Cleaner Production*, 165, 157-167.  
<https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2017.07.067>

Islam, S., M. Bhuiyan, and M. Islam. Chitin and chitosan: structure, properties and applications in biomedical engineering. *Journal of Polymers and the Environment*, 2017, 25(3), p. 854-866. <https://doi.org/10.1007/s10924-016-0865-5>.

Liu, Y., S. Ahmed, D.E. Sameen, Y. Wang, R. Lu, J. Dai, S. Li, and W. Qin. A review of cellulose and its derivatives in biopolymer-based for food packaging application. *Trends in Food Science & Technology*, 2021, 112, p. 532-546. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2021.04.016>

Lu, J., R.C. Tappel, and C.T. Nomura. Mini-review: biosynthesis of poly (hydroxyalkanoates). *Journal of Macromolecular Science®, Part C: Polymer Reviews*, 2009, 49(3), p. 226-248.  
<https://doi.org/10.1080/15583720903048243>

Khan, F.R., Catarino, A.I., & Clark, N.J. (2022). The ecotoxicological consequences of microplastics and co-contaminants in aquatic organisms: a mini-review. *Emerging Topics in Life Sciences*, 6, 339–348. <https://doi.org/10.1042/ETLS20220014>

Kourmentza, C., Plácido, J., Venetsaneas, N., Burniol-Figols, A., Varrone, C., Gavala, H.N., & Reis, M.A.M. (2017). Recent Advances and Challenges towards Sustainable Polyhydroxyalkanoate (PHA) Production. *Bioengineering*, 4(2), 55.  
<https://doi.org/10.3390/bioengineering4020055>

- Kumar, S. and K. Thakur. Bioplastics-classification, production and their potential food applications. *Journal of Hill Agriculture*, 2017, 8(2), p. 118-129. <http://dx.doi.org/10.5958/2230-7338.2017.00024.6>
- Kutralam-Muniasamy, G., Pérez-Guevara, F., Martínez, I. E., & Shruti, V. C. (2021). Overview of microplastics pollution with heavy metals: Analytical methods, occurrence, transfer risks and call for standardization. *Journal of Hazardous Materials*, 415, 125755. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2021.125755>.
- Li, W., Bo Zu, Qingwei Yang, Yinquan Huang, Jiawen Li (2022) Adsorption of lead and cadmium by microplastics and their desorption behavior as vectors in the gastrointestinal environment *Journal of Environmental Chemical Engineering* 10, 107379
- Liao, Y.L., Yang, J.Y., (2020). Microplastic serves as a potential vector for Cr in an in-vitro human digestive model. *Sci. Total Environ.* 703, 134805 <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2019.134805>. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2017.05.064>
- Thakur, M., I. Majid, S. Hussain, and V. Nanda. Poly ( $\epsilon$ -caprolactone): A potential polymer for biodegradable food packaging applications. *Packaging Technology and Science*, 2021, 34(8), p. 449-461. <https://doi.org/10.1002/pts.2572>
- Reddy, M.M.; S. Vivekanandhan, M. Misra, S.K. Bhatia, and A.K. Mohanty. Biobased plastics and bionanocomposites: Current status and future opportunities. *Progress in polymer science*, 2013, 38(10-11), p. 1653-1689. <https://doi.org/10.1016/j.progpolymsci.2013.05.006>
- Mason, S. A., Welch, V. G., Neratko, J., & Adriani, J. (2016). Microplastic pollution is widely detected in US municipal wastewater treatment plant effluent. *Environmental pollution*, 218, 1045-1054. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2016.08.056>
- Masood. Polyhydroxyalkanoates in the food packaging industry, in *Nanotechnology Applications in Food*. 2017, Elsevier, p. 153-177. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-811942-6.00008-X>
- Mothes, S. y Mattusch, J. *Practical Gas Chromatography-Helmholtz Centre for Environmental Research*. Springer-Verlag Berlin Heidelberg, 15:351-370, 2014
- Murariu, M., & Dubois, P. (2016). PLA composites: From production to properties. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 107, 17-46. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2016.04.003>.
- Nechita, P. and M. Roman. Review on polysaccharides used in coatings for food packaging papers. *Coatings*, 2020, 10(6), p. 566. <https://doi.org/10.3390/coatings10060566>

- Nešić, G. Cabrera-Barjas, S. Dimitrijević-Branković, S. Davidović, N. Radovanović, and C. Delattre. Prospect of polysaccharide-based materials as advanced food packaging. *Molecules*, 2019, 25(1), p. 135. <https://doi.org/10.3390/molecules25010135>
- Peniche, W. Argüelles-Monal, and F. Goycoolea. Chitin and chitosan: major sources, properties and applications, in *Monomers, polymers and composites from renewable resources*. 2008, Elsevier, p. 517-542. <https://doi.org/10.1016/B978-0-08-045316-3.00025-9>
- Poletto, M., & Ornaghi Jr., H. (2015). *Cellulose: Fundamental Aspects and Current Trends*. BoD–Books on Demand.
- Mohamed, R.M. & K. Yusoh. A review on the recent research of polycaprolactone (PCL). *Advanced Materials Research*, 2016, 1134, p. 249-255.
- Raj, T., Chandrasekhar, K., Kumar, A. N., & Kim, S.-H. (2022). Lignocellulosic biomass as renewable feedstock for biodegradable and recyclable plastics production: A sustainable approach. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 158, 112130. <https://doi.org/10.1016/j.rser.2022.112130>.
- Skoog, D. A., West, D. M., Holler, F. J., & Crouch, S. R. (2008). *Fundamentos de química analítica (6a. ed)* México D.F.: Cengage Learning.
- Molinaro, S., M. Cruz-Romero, A. Sensidoni, M. Morris, C. Lagazio, and J.P. Kerry. Combination of high-pressure treatment, mild heating and holding time effects as a means of improving the barrier properties of gelatin-based packaging films using response surface modeling. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 2015, 30, p. 15-23. <https://doi.org/10.1016/j.ifset.2015.05.005>
- Raza, Z.A., S. Riaz, and I.M. Banat. Polyhydroxyalkanoates: Properties and chemical modification approaches for their functionalization. *Biotechnology Progress*, 2018, 34(1), p. 29-41. <https://doi.org/10.1002/btpr.2565>
- Shah, A.A.; Hasan, F.; Hameed, A.; Ahmed, S. Biological degradation of plastics: A comprehensive review. Department of Microbiology, Quaid-i-Azam University, Islamabad, Pakistan (2008). <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2007.12.005>
- Shi, M., Xie, Q., Li, Z.-L., Pan, Y.-F., Yuan, Z., Lin, L., Xu, X.-R., Li, H.-X. (2023). Adsorption of heavy metals on biodegradable and conventional microplastics in the Pearl River Estuary, China. Volume 322, 1 April 2023, 121158. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2023.121158>
- Song, D.-L. Tang, X.-L. Wang, and Y.-Z. Wang. Biodegradable soy protein isolate based materials: a review. *Biomacromolecules*, 2011, 12(10), p. 3369-3380. <https://doi.org/10.1021/bm200904x>

- Synowiecki, J. & N.A. Al-Khateeb. Production, properties, and some new applications of chitin and its derivatives. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 2003, 43(2), p. 145-171. <https://doi.org/10.1080/10408690390826473>
- Thompson, R. C., Moore, C. J., vom Saal, F. S., & Swan, S. H. (2009). Plastics, the environment and human health: current consensus and future trends. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 364(1526), 2153-2166. <https://doi.org/10.1098/rstb.2009.0053>
- Tsui, Z.C. Wright, and C.W. Frank. Biodegradable polyesters from renewable resources. *Annual review of chemical and biomolecular engineering*, 2013, 4, p. 143-170. <https://doi.org/10.1146/annurev-chembioeng-061312-103323>
- Volova, T. Polyhydroxyalkanoates-plastic materials of the 21st century: production, properties, applications. 2004: Nova publishers.
- Waheed, M., Mubeen, B., Sarwar, S., Hafeez, H. M., & Ali, Q. (2021). Biosynthesis of poly (hydroxyalkanoates). *Biological and Chemical Sciences Research Journal*, 2021(1). DOI: <https://doi.org/10.54112/bcsrj.v2021i1.71>
- Zhou, Y., Liu, X., Wang, J. (2019). Characterization of microplastics and the association of heavy metals with microplastics in suburban soil of central China. Volume 694, 1 December 2019, 133798. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2019.133798>
- Zhou, Y., Liu, X., Wang, J. (2019). Characterization of microplastics and the association of heavy metals with microplastics in suburban soil of central China. Volume 694, 1 December 2019, 133798.
- Zou, J., Liu, X., Zhang, D., & Yuan, X. (2020). Adsorption of three bivalent metals by four chemical distinct microplastics. *Journal of Environmental Management*, 248 <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2020.126064>

## ANEXOS

### ANEXO 1: PREPARACIÓN DE LAS DISOLUCIONES DE LA DIGESTIÓN GÁSTRICA *IN VITRO*

1. Disolución sintética salivar (S): Se pesan en una balanza analítica las masas correspondientes de cada sal y enzimas recogidas en la Tabla 1 de este Anexo. Se transfieren a un matraz aforado de 50 mL, se añaden 90  $\mu$ L de NaOH (1M) y se enrasa con agua ultrapura. Se mide su pH, se comprueba que esté dentro del rango  $6,5 \pm 0,5$  y se guarda en bote de plástico en nevera hasta su uso.

2. Disolución sintética gástrica (G): Se pesan en una balanza analítica las masas correspondientes de cada sal y enzimas recogidas en la Tabla 2. Se transfieren a un matraz aforado de 100 mL, se añaden 830  $\mu$ L de HCl (37%) y se enrasa con agua ultrapura. Se mide su pH, se comprueba que esté dentro del rango  $1,1 \pm 0,1$  y se guarda en bote de plástico en nevera hasta su uso.

3. Disolución sintética duodenal (D): Se pesan en una balanza analítica las masas correspondientes de cada sal y enzimas recogidas en la Tabla 3.. Se transfieren a un matraz aforado de 250 mL, se añaden 45  $\mu$ L de HCl (37%) y se enrasa con agua ultrapura. Se mide su pH, se comprueba que esté dentro del rango  $7,4 \pm 0,2$  y se guarda en bote de plástico en nevera hasta su uso.

4. Disolución sintética de la bilis (B): Se pesan en una balanza analítica las masas correspondientes de cada sal y enzimas recogidas en la Tabla 4. Se transfieren a un matraz aforado de 100 mL, se añaden 18  $\mu$ L de HCl (37%) y se enrasa con agua ultrapura. Se mide su pH, se comprueba que esté dentro del rango  $8,0 \pm 0,2$  y se guarda en bote de plástico en nevera hasta su uso.

5. Disolución sintética de plasma humano simulado (SBF): Se pesan en una balanza analítica las masas correspondientes de cada sal y enzimas recogidas en la Tabla 5. Se transfieren a un matraz aforado de 100 mL, se añaden 3,9 mL de HCl (1M) y se enrasa con agua ultrapura. Se mide su pH, se comprueba que sea aproximadamente 7,4 y se guarda en bote de plástico en nevera hasta su uso.

Tabla 1. Masas de reactivos empleados para preparar la disolución sintética salivar (S)

<i>Reactivo</i>	<i>Cantidad para 50 mL de disolución (g)</i>
KCl	0,0460
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0,0442
KSCN	0,0138
Na <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	0,0280
NaCl	0,0150
NaOH (1M) ( $\mu$ L)	90
Urea	0,0106
$\alpha$ -Amilasa	0,0078
Mucina	0,0025
Ácido Úrico	0,0008
pH	6,44

Tabla 2. Masas de reactivos empleados para preparar la disolución Gástrica

<i>Reactivo</i>	<i>Cantidad para 100 mL de disolución (g)</i>
KCl	0,0824
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0,0266
NaCl	0,2752
CaCl <sub>2</sub> ·2H <sub>2</sub> O	0,0400
NH <sub>4</sub> Cl	0,0306
HCl, 37% (μL)	830
Urea	0,0085
Glucosa	0,0650
Hidrocloruro de glucosamina	0,0020
Mucina	0,0330
Albúmina de suero bovino	0,3000
Pepsina	0,1000
pH	1,1 ± 0,1

Tabla 3. Masas de reactivos empleados para preparar la disolución Duodenal

<i>Reactivo</i>	<i>Cantidad para 250 mL de disolución (g)</i>
KCl	0,150
NaCl	1,759
NaHCO <sub>3</sub>	1,411
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0,0197
MgCl <sub>2</sub>	0,0060
HCl, 37% (μL)	45
Urea	0,0258
Albúmina de suero bovino	0,250
CaCl <sub>2</sub> · 2H <sub>2</sub> O	0,0508
Pancreatina	0,7499
Lipasa	0,130
pH	7,45 (No hizo falta ajustar)

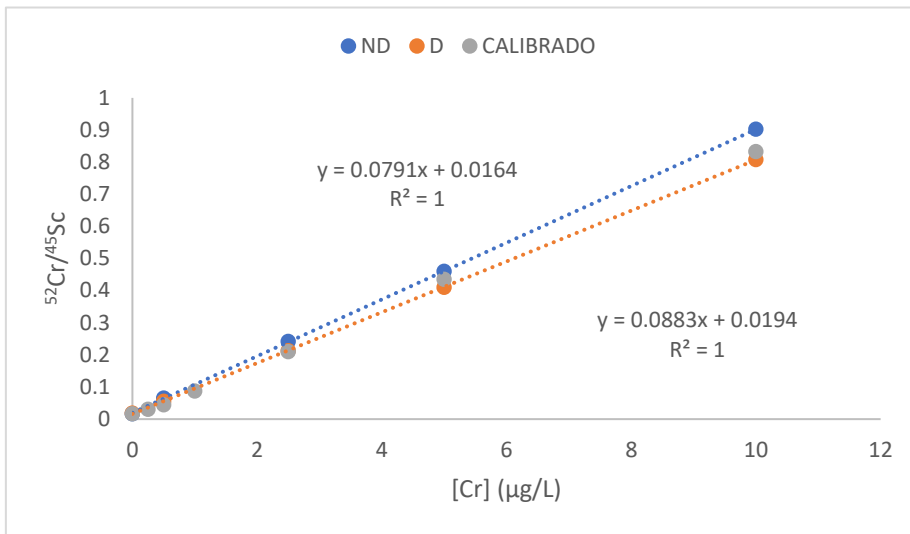
Tabla 4. Masas de reactivos empleados para preparar la disolución Bilis

<i>Reactivo</i>	<i>Cantidad para 100 mL de disolución (g)</i>
KCl	0,0376
NaCl	0,5260
NaHCO <sub>3</sub>	0,5786
HCl (μL)	18
Urea	0,0250
Albúmina de suero bovino	0,1800
CaCl <sub>2</sub> · 2H <sub>2</sub> O	0,0222
Bilis	0,600
pH	8,1 (No hizo falta ajustar)

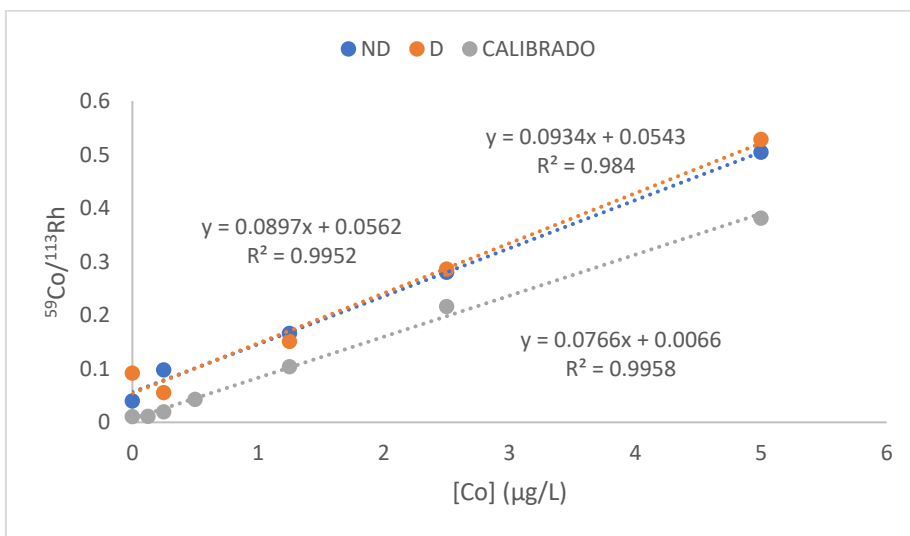
Tabla 5. Masas de reactivos empleados para preparar la disolución SBF

<i>Reactivo</i>	<i>Cantidad para 100 mL de disolución (g)</i>
NaCl	0,8160
NaHCO <sub>3</sub>	0,0360
KCl	0,0259
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0,0184
MgCl <sub>2</sub>	0,0168
HCl 1M (mL)	3,9
CaCl <sub>2</sub> · 2H <sub>2</sub> O	0,0385
Na <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	0,0076
TRIS	0,5517
pH	7,86 (No hizo falta ajustar)

## ANEXO 2: RECTAS DE CALIBRADO Y ADICIÓN

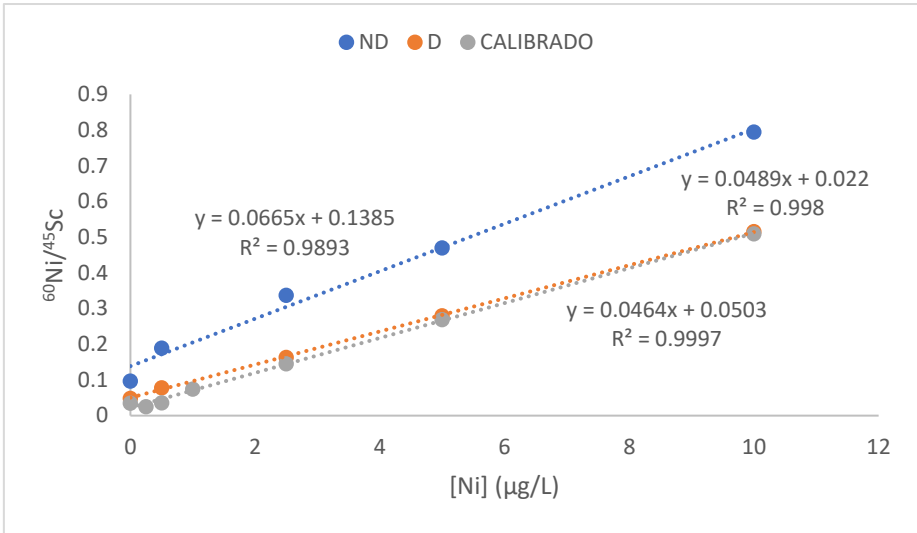


19. Rectas de calibrado y adiciones para el Cr en las fracciones no dializado y dializado

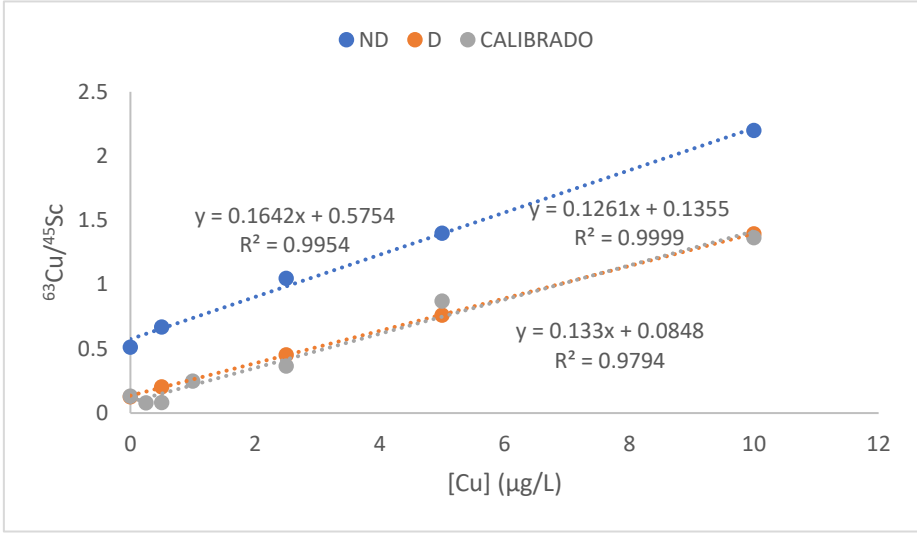


20. Rectas de calibrado y adiciones para el Co en las fracciones no dializado y dializado.

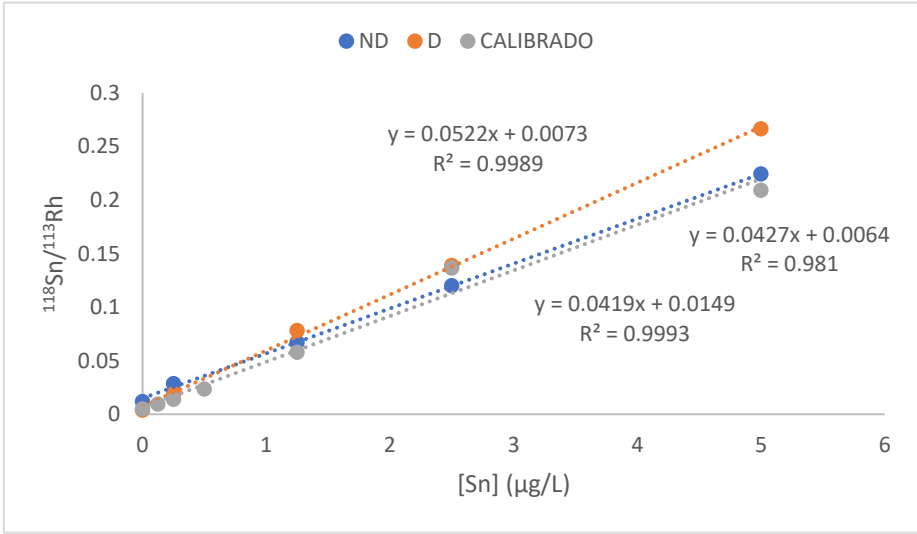




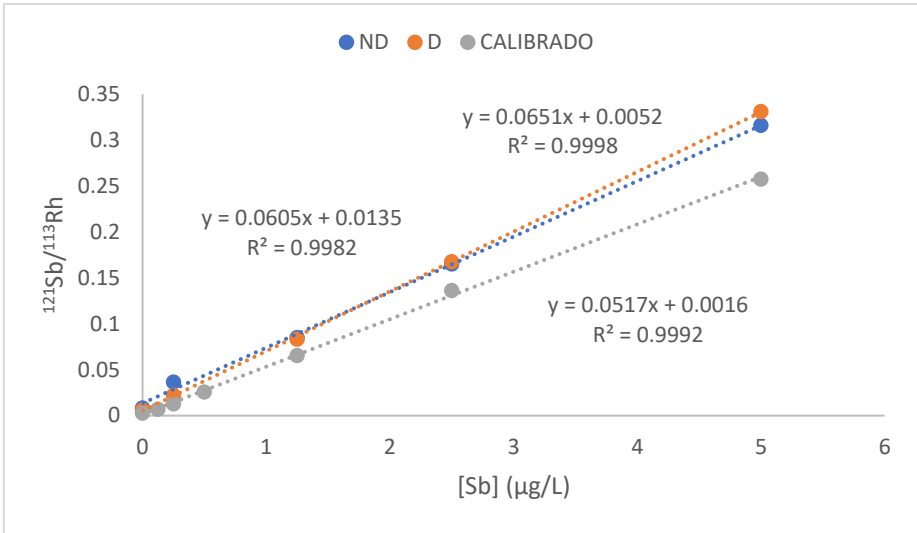
21. Rectas de calibrado y adiciones para el Ni en las fracciones no dializado y dializado.



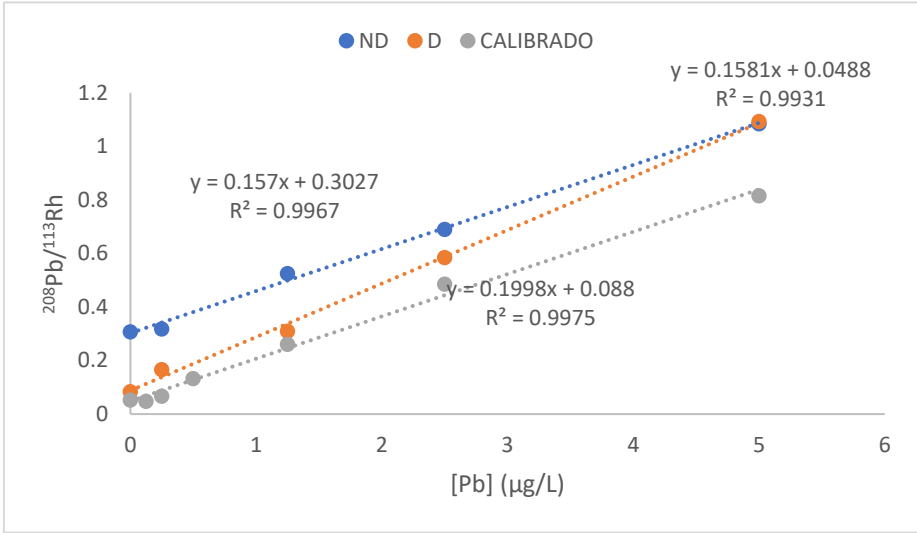
22. Rectas de calibrado y adiciones para el Cu en las fracciones no dializado y dializado.



23. Rectas de calibrado y adiciones para el Sn en las fracciones no dializado y dializado.



24. Rectas de calibrado y adiciones para el Sb en las fracciones no dializado y dializado.



25. Rectas de calibrado y adiciones para el Pb en las fracciones no dializado y dializado.