



SAPIENZA
UNIVERSITÀ DI ROMA

Facoltà di Scienze Matematiche Fisiche e Naturali
Dipartimento di Chimica



Tesi di Dottorato

Ricerca e caratterizzazione di micro e nano plastiche in
alimenti, fluidi biologici e ambienti lavorativi del settore
plastico

Dottorando

Luca Ugo Fontanella

Tutor

Prof.ssa Roberta Curini

Indice

| | |
|---|----|
| Abstract | 5 |
| I Introduzione | 6 |
| 1) Le materie plastiche..... | 6 |
| 2) Le microplastiche..... | 11 |
| 3) Le origini delle microplastiche..... | 13 |
| 4) L'esposizione alle microplastiche..... | 15 |
| 5) Le microplastiche nel sale..... | 17 |
| 6) Le microplastiche nel pulviscolo atmosferico..... | 23 |
| 7) Le microplastiche nel corpo umano..... | 26 |
| 8) Gli effetti dell'esposizione alle microplastiche..... | 30 |
| a) Gli effetti sull'uomo..... | 33 |
| b) La normativa sulle microplastiche..... | 35 |
| 9) I Metodi di analisi delle microplastiche..... | 37 |
| a) Il campionamento..... | 37 |
| b) Il pretrattamento del campione..... | 39 |
| c) Le tecniche di analisi..... | 40 |
| d) Prevenzione della contaminazione e qualità dell'analisi..... | 45 |

| | |
|--|----|
| II Parte sperimentale | 47 |
| 1) L'Analisi del sale..... | 48 |
| a) I campioni di sale..... | 48 |
| b) La prevenzione della contaminazione..... | 49 |
| c) Il pretrattamento del campione..... | 50 |
| d) La microscopia ottica..... | 54 |
| e) I risultati della microscopia ottica..... | 54 |
| f) La spettroscopia Raman..... | 60 |
| g) I risultati della spettroscopia Raman..... | 61 |
| 2) Le tecniche di Imaging applicata all'analisi del sale..... | 65 |
| a) Il pretrattamento del campione..... | 65 |
| b) L'imaging applicato alla spettroscopia Raman..... | 68 |
| c) I risultati dell'analisi di imaging Raman..... | 70 |
| d) L'imaging applicato alla spettroscopia FT-IR..... | 73 |
| e) I risultati dell'analisi di imaging FT-IR..... | 75 |
| 3) Analisi del pulviscolo atmosferico..... | 77 |
| a) Il campionamento e l'analisi del pulviscolo atmosferico..... | 78 |
| b) I risultati dell'analisi del pulviscolo atmosferico..... | 80 |
| 4) Analisi degli indicatori dell'esposizione alle microplastiche: ftalati..... | 83 |

| | |
|--|-----------|
| a) Sviluppo del metodo di analisi degli esteri dell'acido ftalico..... | 83 |
| III Conclusioni..... | 90 |
| IV Ringraziamenti..... | 93 |
| V Bibliografia..... | 94 |

Abstract

Uno degli aspetti più insidiosi dell'inquinamento causato dalla plastica è dovuto alla presenza di micro e nano plastiche nell'ambiente, si tratta di un problema che è stato investigato solo di recente e sul quale non vi è ancora una letteratura scientifica consolidata. L'attenzione della comunità scientifica e dell'opinione pubblica è in crescita su questi nuovi inquinanti a seguito della scoperta di microplastiche nell'organismo umano e negli alimenti, ciò sta lentamente portando i legislatori di vari paesi e dell'Unione Europea ad intervenire sul problema. Questo intervento sta riguardando attualmente la limitazione dell'immissione di plastiche e microplastiche nell'ambiente, ma in futuro potrebbe concretizzarsi ad esempio nell'imposizione di limiti di legge alla contaminazione di microplastiche degli alimenti e nei luoghi di lavoro, di conseguenza vi è la necessità di disporre di un metodo di analisi delle microplastiche per poter valutare l'ampiezza del problema. Lo scopo di questa tesi è di approfondire la conoscenza della contaminazione da microplastiche tramite lo studio, la valutazione e l'impiego di una serie di metodi per l'analisi delle microplastiche in diverse matrici. Questa tesi si concentra sull'analisi delle microplastiche nel sale, un ingrediente presente nella stragrande maggioranza degli alimenti, sul quale vi sono pochi studi, nonostante provenga in gran parte dall'evaporazione dell'acqua di mare dove è nota da tempo la presenza di importanti concentrazioni di microplastiche. Un'altra fonte di assunzione delle microplastiche analizzata da questo studio è l'esposizione professionale alle polveri di microplastiche, sulla quale non vi sono ancora importanti studi; infine è stato studiato un protocollo per l'analisi dei traccianti organici delle microplastiche nei liquidi biologici, nello specifico gli esteri dell'acido ftalico, la cui presenza nelle urine è correlata all'esposizione dell'organismo alle microplastiche. Questo dottorato di ricerca ha compreso delle attività che sono state svolte presso il dipartimento di ingegneria dell'Università di Aalborg, Danimarca, grazie alla collaborazione con il prof. Vollertsen tramite un progetto di mobilità congiunta coordinato dalla prof.ssa Buiarelli; altre attività sono state svolte presso il dipartimento di agricoltura, ambiente ed alimenti dell'Università degli Studi del Molise grazie alla collaborazione del prof. Avino.

Introduzione

Le materie plastiche

Le materie plastiche sono una delle più importanti invenzioni della storia dell'umanità. Anche se i primi prodotti plastici, come l'acetato di cellulosa e la celluloidoide (nitrato di cellulosa plastificato con canfora), risalgono alla fine del XIX secolo, è con la seconda metà del XX secolo che inizia la grande diffusione della plastica [Strong AB (2000)]. La plastica si afferma come materiale per molte applicazioni, dove sostituisce legno, carta, vetro e metallo per le sue caratteristiche: è facile da lavorare, economica, leggera, impermeabile all'acqua ed ha una bassa conducibilità termica, oltre ad essere un isolante elettrico [Andrady (2009)]. Per questi motivi la produzione mondiale di plastica è cresciuta rapidamente, da circa 1,7 tonnellate all'anno dei primi anni '50 del XX secolo a più di 350 milioni di tonnellate all'anno agli inizi degli anni '20 del XXI secolo [Napper (2020)] [Geyer (2017)]. Sono prodotte industrialmente centinaia di differenti tipi di polimeri sintetici, alcuni con applicazioni molto specifiche, ma oltre il 65% della produzione mondiale di materie plastiche riguarda pochi tipi di polimeri: il polietilene (PE, ~28,5%), il polipropilene (PP, ~16,7%), il polivinilcloruro (PVC, ~9,1%), il polietilene tereftalato, (PET, ~8,1%) ed il polistirene (PS, ~6,1%); inoltre circa il 18% della produzione mondiale riguarda due classi di polimeri: poliuretani (PU) e poliammidi (PA) [PlasticsEurope (2015)] [Oktavilia (2020)] (Tabella 1).

| Polimero | Classificazione | Densità media (kg/m³) [MatWeb] | Produzione 2015 (10⁶ tonnellate) [MatWeb] |
|-------------------------------|------------------------|--|---|
| Polietilene (PE) | Termoplastico | 921 -958 | 116 |
| Polipropilene (PP) | Termoplastico | 915 | 68 |
| Polistirene (PS) | Termoplastico | 983 | 25 |
| Polietilene tereftalato (PET) | Termoplastico | 1330 | 33 |

| | | | |
|------------------------|----------------|-----------|----|
| Polivinilcloruro (PVC) | Termoplastico | 1390 | 38 |
| Poliuretani (PU) | Termoindurente | 1200 | 17 |
| Poliammidi (PA) | Termoplastico | 1020-1050 | 58 |

Tabella 1: lista dei polimeri prodotti in maggiori quantità

I prodotti plastici generalmente non sono composti integralmente dal polimero, ma contengono una serie di additivi che ne modificano le proprietà chimiche e fisiche; queste sostanze sono aggiunte specificamente per migliorarne determinate caratteristiche, a queste sostanze si aggiungono i residui dei vari stadi del processo produttivo ed eventualmente dei contaminati esterni. Tutte queste sostanze rendono le plastiche dei prodotti complessi e ne complicano l'interazione con l'ambiente, sia durante il loro uso che quando diventano un rifiuto. Vi sono centinaia di singoli additivi per le plastiche [Plastics Additives and Testing (2013)] [Plastics Additives Handbook (2009)], tuttavia possono essere classificati in base alle loro funzioni ed i loro effetti (tabella 2).

| Funzione | Effetto primario | Effetto indesiderato | Esempio |
|----------------------|--|--|-----------------------------------|
| Carica inerte | Riempitivo | Aumento della densità | Silice |
| Rinforzanti | Miglioramento delle qualità meccaniche | Aumento della densità | Fibra di vetro |
| Ritardanti di fiamma | Combustione endotermica | Presenza di organoalogenuri nel prodotto | Organobromuri e Sb_2O_3 |
| Coloranti | Colorazione | Alcuni coloranti contengono metalli pesanti | Ftalocianine di rame (blu, verde) |
| Plastificanti | Maggiore lavorabilità | Alcuni plastificanti sono degli interferenti endocrini | Esteri dell'acido ftalico |
| Antiossidanti | Maggior resistenza alla fotodegradazione | Maggior resistenza alla biodegradazione ambientale | Bisfenoli |
| Biocidi | Resistenza alla biodegradazione | Presenza dell'additivo organico, irritante, nel prodotto | N-Ottilisotiazolinone |
| Stabilizzanti | Aumento della resilienza alle alte temperature | Presenza di metalli nel prodotto | Stearato di piombo |

Tabella 2: le principali classi di additivi delle plastiche ed i loro effetti

La presenza di queste sostanze nella plastica ne complica lo smaltimento ed il riciclo, nella frazione di plastica dispersa nell'ambiente queste sostanze possono causare degli effetti nocivi. Il principale uso delle materie plastiche, per volumi impiegati, è il confezionamento di altri prodotti, come cibo, prodotti di consumo e semilavorati industriali, per queste applicazioni si utilizzano spesso PE, PP, PET e PS; il secondo settore per consumi di plastiche è l'edilizia, dove vi è un importante uso del PVC nelle tubature. Un altro settore che impiega grandi volumi di plastica è l'industria tessile, dove al consumo di PA (es. Nylon), PU (es. Spandex), PE e PP (poliolefine isolanti) si è aggiunto il consumo di PET per i tessuti non tessuti; il quarto settore per utilizzo di materie plastiche è quello dei prodotti di consumo per le industrie e per i consumatori, tra cui vi sono i prodotti usa e getta, con un uso di importanti volumi di PE, PP, PS e PET. Delle maggiori plastiche prodotte solo il PU è termoindurente, PE, PP, PVC, PET, PS e PA sono termoplastiche, inoltre il PET, il PVC, i PU ed alcune PA presentano una densità superiore a quella dell'acqua e dell'acqua di mare ($1020 - 1029 \text{ kg/m}^3$) [Nayar (2016)]. Questo enorme volume di prodotti di plastica viene utilizzato mediamente per un periodo di tempo molto breve e diventa rapidamente un rifiuto: la quasi totalità di prodotti per il confezionamento (packaging) terminano il loro impiego in meno di un anno, la maggior parte dei prodotti di consumo diventano rifiuti entro 5 anni dalla loro produzione e non esistono volumi significativi di prodotti plastici impiegati nell'industria tessile che sono in utilizzo dopo i 10 anni. Un'importante eccezione è quella dei materiali plastici per l'edilizia, che vengono utilizzati per decenni prima di diventare rifiuti. [Murakami (2010)]. L'enorme volume di plastica che ogni anno diviene un rifiuto è uno dei problemi ambientali del nostro pianeta, [Haraway (2015)] [Nielsen (2020)], al punto che la sua gestione sostenibile è compresa nel 12° obiettivo per lo sviluppo sostenibile (OSS), garantire modelli sostenibili di produzione e di consumo, dell'Agenda 2030 che deriva dalla risoluzione delle Nazioni Unite (A/RES/70/1) approvata dall'Assemblea generale dell'ONU il 25 settembre 2015 [ONU (2015)]. Lo smaltimento dei rifiuti plastici avviene in tre modi: il riciclaggio, l'incenerimento e l'immissione nell'ambiente, per dispersione o tramite lo stoccaggio in discariche. Il riciclaggio della plastica è fortemente cresciuto negli anni: da una frazione trascurabile al livello globale si è arrivati al 14-18 %

di plastica riciclata nel 2017, tuttavia vi sono forti differenze regionali nelle percentuali di riciclo dei rifiuti plastici: EU 34 % [Plastics europe (2021)] [D'Ambrières (2019)], USA 8 % [Heller (2020)] e Cina 28% [Yuedong (2019)]. Il riciclaggio della plastica è una tecnica che permette di produrre nuovi prodotti plastici dai rifiuti, ma che richiede un rifiuto integralmente plastico ed un'adeguata infrastruttura industriale; quasi tutta la plastica viene riciclata con un metodo meccanico-termico: il rifiuto plastico viene separato per densità, macinato e fuso per dare nuovi pellets di polimero, di qualità inferiore all'originale che spesso vengono usati come carica inerte nell'edilizia [Siddique (2008)] [Almeshal (2020)]. Circa il 2% della plastica inviata al riciclo viene trattata con il riciclaggio chimico che prevede la depolimerizzazione ed il recupero dei monomeri, si tratta di una tecnica applicata recentemente su scala industriale e che richiede un processo di lavorazione più complesso rispetto al processo meccanico-termico [Rhett (2020)]. Le plastiche maggiormente riciclate sono il PE ed il PET [D'Ambrières (2019)]. L'incenerimento della plastica è un metodo di smaltimento del rifiuto che produce energia ed è in crescita, arrivando nel 2017 al 24-25% del totale [Geyer (2017)], anche se è in calo negli USA ed in EU, il suo punto di forza è la possibilità di trattare rifiuti plastici contenenti importanti quantità di rifiuti cartacei ed organici e di conseguenza di richiedere una minore differenziazione del rifiuto. Circa il 60% dei rifiuti plastici sono immessi nell'ambiente [EPA (2014)], anche se con modalità molto diverse, in quanto la plastica viene in gran parte stoccata in discariche, mentre una frazione consistente, si stima 30 milioni di tonnellate all'anno [Browning (2021)], viene gestita impropriamente, con un parziale rilascio nell'ambiente. Vi è una forte differenza tra le nazioni ad alto reddito come i Paesi europei, gli Stati Uniti, Australia, Nuova Zelanda, Giappone e Corea del Sud dove meno del 10% dei rifiuti prodotti viene disperso nell'ambiente (anche se ne sono dei grandi produttori), ed i Paesi in via di sviluppo, come il sud-est asiatico, dove la produzione di rifiuti plastici è in forte crescita, dove anche l'80% dei rifiuti plastici viene disperso nell'ambiente [Ambeck (2015)]. Una parte di questi rifiuti plastici finisce nei fiumi, il fiume cinese Yangtze, il "fiume azzurro" è il fiume più inquinato dalla plastica [Lebreton, L. C (2017)] ed è stato stimato che da 4 a 12 milioni di tonnellate di rifiuti plastici vengono riversati ogni anno nel mare [Jambeck (2015)]. Il volume di

plastica negli oceani è stimato attorno a 269 milioni di tonnellate [Eriksen (2014)], la cui frazione galleggiante viene trasportata dalle correnti e forma delle enormi isole di plastica, la più grande delle quali, nell'oceano Pacifico misura oltre un 1.500.000 Km² (tre volte le dimensioni della Spagna) [Ryan (2009)]. La crescente preoccupazione per l'inquinamento del mare da parte della plastica ha spinto l'ONU a comprendere nel 14° obiettivo per lo sviluppo sostenibile la tutela del mare e dei corsi d'acqua [Walker (2021)]. La plastica è un prodotto che si degrada in maniera estremamente lenta nell'ambiente [Chamas (2020)] in quanto pochissimi organismi viventi sono in grado di nutrirsi dei polimeri plastici [Kale (2015)], inoltre è stato dimostrato che alcune alghe possono utilizzare i rifiuti plastici come supporto, schermanoli dalla degradazione [Gerritse (2020)], ma recentemente è stato scoperto un batterio *Ideonella sakaiensis* in grado di degradare il PET [Yoshida (2016)]. La principale via di decomposizione della plastica nell'ambiente è la fotolisi, che permette l'ossidazione e la rottura delle catene polimeriche, rendendo possibile il successivo attacco del materiale da parte dei batteri che riescono a nutrirsi delle molecole organiche generate. Si tratta di un processo di corrosione della superficie plastica che può procedere a velocità di decine o centinaia di micron l'anno e che è condizionato dal tempo di esposizione alla luce solare ed alla sua intensità, a sua volta condizionata dalla latitudine. La presenza di additivi antiossidanti o biocidi rallenta ulteriormente il processo di degradazione. I lunghi tempi della fotodegradazione favoriscono la degradazione meccanica del rifiuto plastico, si tratta di un processo causato dai ripetuti cicli di dilatazione contrazione termica [Song (2020)] e dell'indurimento del prodotto plastico, in parte dovuto alla prima fase della fotodegradazione (l'invecchiamento del polimero) ovvero il cross-linking tra le catene polimeriche che riduce la flessibilità della plastica. La graduale perdita delle proprietà meccaniche della plastica facilita la frammentazione del rifiuto plastico a seguito di sollecitazioni meccaniche, si tratta di un processo che altera poco la massa complessiva del rifiuto plastico, ma che causa la produzione delle microplastiche.

Le microplastiche

Uno degli aspetti più insidiosi dell'inquinamento da plastica è la formazione di micro e nano plastiche in quanto come è ben noto che al diminuire delle dimensioni aumentano i rischi che esse comportano per la salute. Anche se i primi studi sulle particelle di plastica nell'ambiente risalgono agli anni '70 [Carpenter (1972)] [Colton (1974)], si tratta di un problema che solo di recente è stato ampiamente investigato, al punto che vi è ancora un dibattito sulla definizione di microplastica, termine che è diventato d'uso a partire dai primi anni duemila [Thompson (2004)], sia dal punto di vista delle dimensioni che della composizione [A.J. Verschoor (2015)]. Benché vi sia un sostanziale accordo sul definire come microplastica una particella solida composta principalmente da polimeri sintetici, vi sono delle controversie sul considerare microplastiche le particelle derivanti da polimeri semi sintetici derivanti dalla biomassa o biopolimeri, secondo la definizione IUPAC [Michel (2012)] come l'acido polilattico e l'acetato di cellulosa. Si tratta di una questione importante per il futuro in quanto la produzione di biopolimeri che attualmente copre l'1% della produzione totale di plastica è in forte crescita [Bioplastics market data (2018)] e vi sono degli articoli sugli effetti delle particelle rilasciate dai biopolimeri [Weinstein (2020)] [Khalid (2021)] [Duan (2022)] [Zhang (2022)]. Il più importante problema nel definire le microplastiche sono le dimensioni: la IUPAC definisce microparticella una particella di dimensioni comprese tra 10^{-4} m e 10^{-7} m e nanoparticella una particella di dimensioni comprese tra 10^{-7} m e 10^{-9} m [M. Vert (2012)], ma nella letteratura scientifica vengono indicati diversi intervalli di dimensioni. In particolare, un comitato scientifico dell'Unione Europea sull'inquinamento del mare [Report EUR 26113 (2013)] [Directive 2008/56/EC] distingue tra “grandi microplastiche” di dimensioni comprese tra 5-1 mm e microplastiche di dimensioni comprese tra 1 mm e 20 μ m, mentre report dell'EFSA (l'autorità europea per la sicurezza alimentare) definisce le dimensioni delle microplastiche comprese tra 5 mm e 20 μ m [EFSA (2016)]. Varie agenzie dell'ONU dividono i rifiuti plastici dispersi nell'ambiente in: megaplastiche (maggiori di 1 m), macroplastiche (1 m – 25 mm), mesoplastiche (25 mm – 5 mm), microplastiche (5 mm – 1 μ m) e nanoplastiche (inferiori di

1 μm) [GESAMP (2015)], mentre diversi articoli scientifici definiscono microplastiche le particelle di dimensioni comprese tra 330 μm ed 1 μm [Lenz (2015)] [Anderson (2017)] (grafico 1).

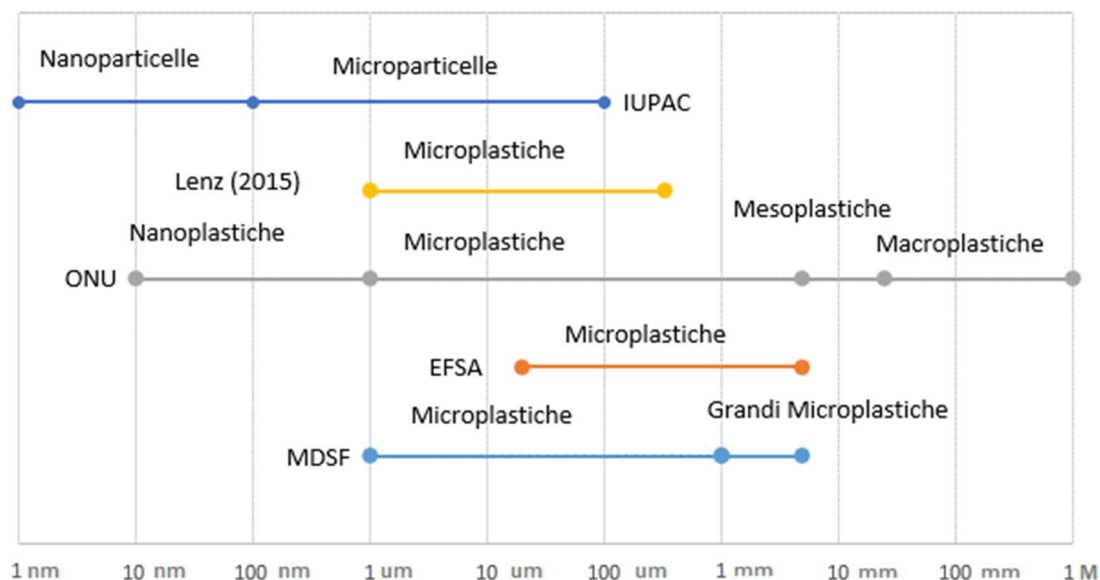


Grafico (1) alcuni intervalli di classificazione per le microplastiche

Le microplastiche possono essere ulteriormente caratterizzate in base alla forma: si possono dividere in fibre, pellets e frammenti. Le fibre sono caratterizzate da una lunghezza molto superiore alla larghezza ed allo spessore, i pellets sono sferoidali, con le tre dimensioni dello stesso ordine di grandezza, mentre i frammenti sono particelle “piane” e dalla forma irregolare, caratterizzate da uno spessore molto inferiore rispetto alla lunghezza ed alla larghezza, che sono tra di loro dello stesso ordine di grandezza [GESAMP (2019)]. Il colore delle microplastiche può essere quello originario dell’oggetto in plastica da cui proveniva oppure derivare dal processo di degradazione del polimero, ad esempio la fotodegradazione rende opache le plastiche trasparenti ed ingiallisce le plastiche chiare, ma il colore può anche derivare da contaminati esterni o dall’attività di biodegradazione [Galgani (2017)]. Le microplastiche sono particelle complesse in quanto ognuna di loro ha specifiche caratteristiche fisico-chimiche, che sono soggette a variazioni nel corso del tempo e che ne condizionano il comportamento, inteso come tempo di degradazione, movimento ed interazioni con l’ambiente [Koelmans (2019)].

Le origini delle microplastiche

Le microplastiche presenti nell'ambiente si possono classificare a seconda della propria origine in due categorie: le microplastiche primarie e le microplastiche secondarie. Le microplastiche primarie sono piccole particelle polimeriche che sono state prodotte a livello industriale e successivamente disperse nell'ambiente, accidentalmente o per il loro uso. Questa categoria comprende le microsfele nei prodotti per la cura e l'igiene personale come cosmetici, saponi e dentifrici [Cole (2011)] [Alomar (2016)], oltre ai pellets di plastica persi durante il trasporto o la lavorazione della plastica. La percentuale di microplastiche primarie nell'ambiente è minoritaria, ad eccezione di certi grandi laghi statunitensi situati vicino ad importanti impianti industriali [Eriksen (2013)]. Le microplastiche secondarie sono prodotte dalla degradazione meccanica della plastica, sia durante l'utilizzo di un prodotto plastico che durante la degradazione meccanica dei rifiuti plastici. Le più importanti fonti di microplastiche secondarie sono: il rilascio di fibre durante il lavaggio dei tessuti sintetici [Browne (2011)], il consumo delle gomme dei veicoli, la degradazione dei manufatti plastici esposti alle intemperie e la degradazione dei rifiuti plastici in mare [Bouche (2017)] (Figura 1). Le microplastiche sono leggere e possono essere facilmente trasportate dai flussi d'acqua e di conseguenza possono essere trasportate nei fiumi, dove sono state trovate importanti concentrazioni di microplastiche [Wagner (2014)] [Klein (2015)] [Mani (2015)] [Lechner (2014)] [Morritt (2014)]. I fiumi sono sistemi dinamici che possono trattenere o trasportare le microplastiche, ma vi sono ancora pochi studi che correlano la variazione del volume delle microplastiche trasportate da un fiume con la variazione della portata del fiume [Rech (2014)]. In particolare, si sospetta che la caduta di un importante volume di pioggia nel bacino idrografico di un fiume aumenti il volume di microplastiche trasportate in mare, ma la dimostrazione di questo tipo di correlazione è resa difficile dalle molte vie con cui le microplastiche entrano nei fiumi [Sadri (2014)], in particolare gli scarichi urbani ed industriali. Gli scarichi di acque urbane ed industriali nei fiumi e nei mari sono un importante fonte di microplastiche nell'ambiente anche se subiscono un trattamento di depurazione standard [Browne 2011] [Storck et al. 2015], infatti una larga frazione di microplastiche non

precipita per densità sul fondo dell'impianto con i fanghi e viene immessa nell'ambiente. Recentemente sono stati sviluppati impianti che riducono i volumi di microplastiche emesse [Murphy (2016)] [Carr (2016)], tuttavia i pochi studi quantitativi che considerino la rimozione delle microplastiche in ogni fase del processo di trattamento rende questa un'area di alta priorità per ulteriori ricerche [Liu, F. (2020)]. Le microplastiche possono essere trasportate dal vento come pulviscolo atmosferico, anche per lunghe distanze [Allen (2019)], andando a contaminare anche zone remote con attività antropica molto bassa o addirittura assente [Zhang (2019)], rendendo le microplastiche un contaminante ubiquitario. Il movimento delle microplastiche avviene generalmente dalla terraferma verso il mare: circa l'80% delle microplastiche nel mare deriva da prodotti consumati sulla terraferma (microplastiche primarie) o rifiuti plastici dispersi sulla terraferma (microplastiche secondarie); solo il 20% circa delle microplastiche deriva da attività svolte in mare, principalmente dall'usura delle reti da pesca e delle parti plastiche delle navi, ma anche dalle perdite del trasporto di pellets e prodotti plastici, oltre che dallo smaltimento illegale di rifiuti plastici in mare [Landon-Lane, 2018]. Il mare è un grande bacino di raccolta di plastiche e la presenza di microplastiche è stata documentata in svariati ecosistemi marini sparsi in tutto il mondo: nei mari e negli oceani, dalle coste e le spiagge alle profondità marine e persino nel circolo polare artico ed antartico [Andrady (2017)] [Lots (2017)] [Zhang (2017)] [Suaria (2020)]. La presenza di microplastiche in ambienti così remoti e lontani dalle fonti di inquinamento antropico è stata imputata al ruolo chiave svolto dalle correnti marine che veicolerebbero le microparticelle in distretti molto distanti rispetto al loro punto di rilascio [Alomar (2016)] mentre le mareggiate, le spingerebbero a depositarsi in prossimità delle coste [Lo (2020)]. Le microplastiche che arrivano in mare possono depositarsi sul fondale marino, questo processo può avvenire per la maggior densità della particella rispetto all'acqua di mare e quindi coinvolge principalmente le particelle composte da PVC, PET, PU e PA, ma la presenza di alcuni additivi, come la silice, può far precipitare anche polimeri più leggeri come il PE, PP e PS. Un altro processo che causa la precipitazione dei polimeri leggeri sui fondali avviene tramite un meccanismo molto lento di inglobamento delle particelle plastiche nei detriti ed è facilitato dalla colonizzazione superficiale dei

frammenti plastici da parte di microrganismi in grado di formare biofilm che determinano un aumento di peso delle particelle favorendone la deposizione [Miao (2019)] [Tu (2020)].



Figura (1): i rifiuti plastici abbandonati possono diventare fonti di microplastiche

L'esposizione alle microplastiche

Le microplastiche sono ubiquitarie e l'uomo ne è costantemente esposto, alcune forme di esposizione alle microplastiche sono molto più significative di altre. La principale fonte di assunzione di microplastiche è quella gastro-intestinale per ingestione delle microplastiche con il cibo e le bevande, una fonte secondaria di assunzione è tramite la respirazione delle microplastiche, che tuttavia in alcuni ambienti molto contaminati può diventare significativa, mentre non è stato osservato l'assorbimento delle microplastiche

nell'organismo tramite il derma, a differenza di altri contaminanti organici. La presenza di microplastiche negli alimenti può derivare dalla confezione [Jadhav (2021)] o addirittura si possono formare delle microplastiche aprendo delle confezioni [Sobhani (2020)] ed in alcuni prodotti sono state trovate decine di microplastiche provenienti dalle confezioni alimentari [Du (2020)]. Un particolare caso di studio che ha destato preoccupazione riguarda la presenza di microplastiche nell'acqua in bottiglia [Schymanski (2019)]: sono state identificate dalle 28 alle 241 particelle plastiche per litro d'acqua in una serie di bottiglie di PET riutilizzate, mentre ne sono state osservate dalle 2 alle 44 per litro d'acqua rilevate in altre bottiglie di PET utilizzate solo una volta; in ogni caso oltre il 70% delle particelle erano di dimensioni comprese tra i 5 ed i 20 μm . Questo studio suggerisce un significativo rilascio di particelle di PET quando si riutilizza varie volte la bottiglia: oltre l'80% delle microplastiche era composto da PET, mentre nelle bottiglie utilizzate una sola volta il PET costituiva il 60% delle particelle; di questo studio bisogna considerare anche l'alta variabilità del contenuto di microplastiche da bottiglia a bottiglia che dimostra le difficoltà nell'ottenere dati riproducibili. Il consumo di prodotti ittici può essere una fonte di assunzione di microplastiche tramite l'alimentazione, in particolare sono state riscontrate le microplastiche nei molluschi bivalvi [Bom (2021)] [Renzi (2018)], tra cui alcune specie molto diffuse nell'alimentazione come le cozze, *Mytilus edulis* [Van Cauwenberghe (2014)], (in media 0,3-0,07 particelle per grammo) e le vongole veraci, *Tapes philippinarum* [Cho (2019)] (in media 0,3 particelle per grammo). Sono state trovate delle microplastiche in molte specie di pesci ampiamente consumate nella dieta umana, come il nasello europeo, *Merluccius merluccius* [Neves (2015)], la sardina, *Sardina pilchardus* [Renzi (2019)], lo sgombro, *Scomber scombrus* [Lopes (2020)], la sogliola comune, *Solea solea* [Pellini (2018)], il tonno rosso [Romeo (2015)], la platessa, *Pleuronectes platessa* [Welden et al. (2018)] e l'acciuga europea, *Engraulis encrasicolus* [Renzi (2019)]. Nel caso degli studi sui pesci sono state trovate mediamente da 1 a 5 particelle microplastiche per esemplare, con una concentrazione per grammo molto inferiore rispetto a quella dei molluschi bivalvi che sono organismi filtratori e tendono ad accumulare le microplastiche aspirate [Barboza (2018)].

Le microplastiche nel sale

Una delle forme più insidiose di assunzione delle microplastiche è tramite il sale, un ingrediente ampiamente utilizzato nell'alimentazione dalla stragrande maggioranza della popolazione mondiale e che è presente praticamente in ogni cibo confezionato [Dötsch (2009)]. Il consumo di sale delle persone può essere molto variabile, ma è collegato al tipo di alimentazione, di conseguenza si può parlare di un consumo di sale medio per popolazioni o fasce di popolazione che seguono un determinato regime dietetico regionale; questa assunzione permette di stimare il consumo giornaliero medio di sale, che presenta forti variazioni regionali. (tabella 3) (grafico 2) Da notare che questo consumo giornaliero medio eccede il livello raccomandato di 5 g/giorno dall'organizzazione internazionale della sanità [WHO (2007)].

| Nazione | EU Commission (2014) | Powles et al. (2013) |
|-----------------|-----------------------------|-----------------------------|
| Austria | 8,5 | 9,96±1,71 |
| Belgio | 10,5 | 8,70±1,13 |
| Bulgaria | 7,1 | 9,13±1,21 |
| Cipro | 6,5 | 10,24±3,40 |
| Repubblica Ceca | 13,6 | 10,04±3,45 |
| Danimarca | 8,6 | 8,25±1,51 |
| Estonia | 10,0 | 9,96±1,36 |
| Finlandia | 8,1 | 9,71±1,11 |
| Francia | 8,6 | 9,51±0,98 |
| Germania | 6,3 | 8,93±0,93 |
| Italia | 9,6 | 11,15±0,98 |
| Lettonia | 7,3 | 10,57±3,63 |
| Lituania | 9,0 | 10,26±3,20 |
| Norvegia | 10,0 | 9,58±3,15 |
| Paesi Bassi | 8,7 | 8,37±1,16 |

| | | |
|-------------|------|-------------|
| Polonia | 11,5 | 9,68±1,13 |
| Portogallo | 12,3 | 10,69±1,34 |
| Regno Unito | 8,1 | 9,10±0,83 |
| Romania | 11,1 | 10,39 ±3,45 |
| Slovacchia | 7,6 | 10,67±3,66 |
| Slovenia | 12,7 | 10,60±2,12 |
| Spagna | 10,0 | 10,14±1,26 |
| Svezia | 8,0 | 9,20±0,98 |
| Svizzera | 9,0 | 9,10±1,13 |
| Ungheria | 12,5 | 10,67±1,77 |

Tabella 3: Assunzione di sale media (g/giorno) determinato dall'analisi del sodio nelle urine in due studi

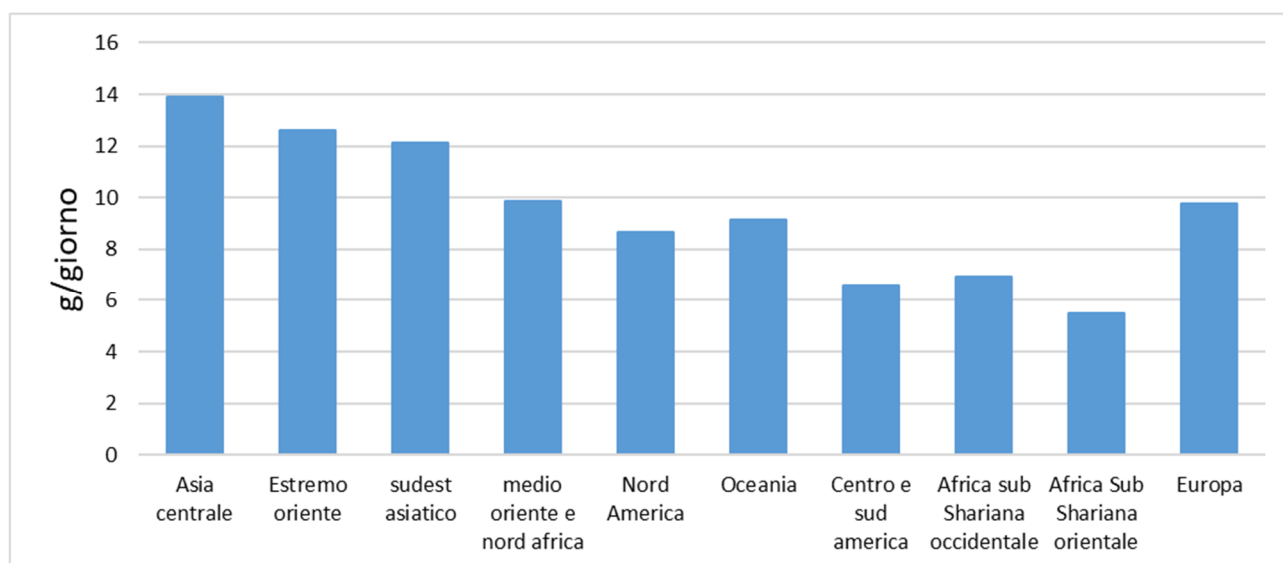


Grafico 2: Consumo di sale (g/giorno) stimato per le varie regioni del mondo [Kloss (2015)]

Una parte del sale assunto con l'alimentazione deriva dal contenuto naturale degli alimenti, ovvero dal contenuto di sodio e dei cloruri presenti nei vegetali e nei tessuti animali, ma si stima che dal 75% all'80% del sale assunto sia un ingrediente aggiunto al cibo [Anderson (2010)]. Sono particolarmente ricchi di sale i prodotti a base di carne lavorata, da 0,5 fino a 4 g per 100g di prodotto [Inguglia (2017)], i prodotti caseari, da 0,6 a 2,5 g per 100 g di

prodotto [Hashem (2014)] ed alcune classi di “spuntini” o “snack”, alimenti spesso a base di cereali, patate o arachidi con un contenuto di sale compreso tra 0,5 e 7 g per 100 g di prodotto [Webster (2010)]. In estremo oriente la salsa di soia è un’importante fonte di sale nell’alimentazione (12,5-20 g per 100 g di prodotto) [Huang (2016)]. Le fonti da cui si può estrarre il sale sono l’acqua di mare ed i depositi salini sotterranei di Halite o salgemma, ma vi sono anche le pianure saline come il Salar de Uyuni in Bolivia e le sorgenti saline come quella di Maras in Perù. Il sale viene prodotto essenzialmente in due modi: per estrazione del minerale o per evaporazione di una soluzione salina che può avvenire in una salina ossia all’aperto grazie al riscaldamento naturale o industrialmente riscaldando artificialmente la soluzione. Recentemente è stato sviluppato un nuovo metodo per estrarre il salgemma senza dover scavare una miniera: tramite la trivellazione si introducono una serie di tubi nel deposito naturale di sale, circondato da strati argillosi impermeabili, si pompa acqua nel giacimento e si aspira la soluzione salina satura, da cui si ottiene il sale tramite un evaporatore industriale [Warren (2016)]. La produzione mondiale di sale nel 2020 è stata di 270 milioni di tonnellate, di cui circa il 4% è utilizzato per usi alimentari, i primi due produttori mondiali di sale sono gli Stati Uniti d’America e la Cina, l’Italia ha prodotto nel 2020 circa 4000 tonnellate di sale posizionandosi al decimo posto come produttore mondiale [U.S. Geological Survey (2021)]. Circa il 40% del sale prodotto nel mondo è ottenuto dall’acqua di mare, il 60% da giacimenti del minerale. La produzione del sale in salina è un processo di precipitazione frazionata su larga scala: l’acqua di mare contiene molti ioni che non devono essere presenti in quantità superiori alle tracce nel prodotto finale, il quale deve avere un titolo di NaCl $\geq 99,5\%$ [Codex (1985)] (tabella 4) (tabella 5).

| Elemento | mg/Kg |
|-----------------|--------------|
| As | < 0,5 |
| Cu | < 2 |
| Pb | < 2 |
| Cd | < 0,5 |

Tabella 4: Limiti per i metalli pesanti nel sale per uso alimentare [Codex (1985)]

| Ione | g/kg |
|-------------------------------|-------------------------|
| Cl ⁻ | 19,352 |
| Na ⁺ | 10,784 |
| SO ₄ ²⁻ | 2,712 |
| Mg ²⁺ | 1,284 |
| Ca ²⁺ | 0,412 |
| K ⁺ | 0,399 |
| HCO ₃ ⁻ | 0,108 |
| Br ⁻ | 0,067 |
| CO ₃ ²⁻ | 0,016 |
| Sr ²⁺ | 0,008 |
| F ⁻ | 0,001 |
| Li ⁺ | 1,73 · 10 ⁻⁴ |
| Rb ⁺ | 1,20 · 10 ⁻⁴ |
| Ba ²⁺ | 2,0 · 10 ⁻⁵ |
| Fe ³⁺ | 1,3 · 10 ⁻⁶ |

Tabella 5: Concentrazione dei principali ioni nell'acqua di mare [Dickson (1994)]

Le saline sono composte da una serie di vasche di grandi dimensioni ma poco profonde, in modo da favorire l'evaporazione dell'acqua di mare che viene fatta passare da una vasca all'altra quando raggiunge una determinata densità, dovuta all'aumentata concentrazione degli ioni. L'aumento della concentrazione degli ioni nell'acqua delle saline ne causa la precipitazione come sali quando viene superata la concentrazione limite di solubilità, questo processo porta alla precipitazione iniziale dell'ossido ferrico, quando la densità della soluzione arriva a 1,051 Kg/L o 7 Baumé (unità di misura della densità non ufficiale nelle saline). Il successivo sale che precipita è il carbonato di calcio, quando la densità raggiunge 1,125 Kg/L o 16 Baumé, seguito dal solfato di calcio che in gran parte precipita quando la densità dell'acqua raggiunge 1,21 Kg/L o 25 Baumé. Questi processi avvengono nelle vasche di evaporazione, successivamente l'acqua viene trasferita nelle vasche di

precipitazione, più piccole (circa un settimo o un ottavo delle precedenti), dove il cloruro di sodio precipita dalle soluzioni con densità compresa tra 1,216 Kg/L (25,7 Baumè) e 1,262 Kg/L (30 Baumè). Le soluzioni più dense di 30 Baumè non sono utilizzate per la raccolta del cloruro di sodio in quanto iniziano a precipitare il solfato ed il bromuro di magnesio [Agha (2002)]. Le saline coprono dalle centinaia alle migliaia di ettari, la più grande salina d'Europa si trova a Margherita di Savoia (figura 3), in Puglia e copre 4000 ettari, altre importanti saline italiane sono a Cervia (827 ettari) (figura 2), Trapani (910 ettari) (figura 5) e Cagliari (2700 ettari) (figura 4), in condizioni ottimali si possono ottenere fino a 1300 tonnellate di sale per ettaro di salina.



Figura 2: Salina di Cervia (Ravenna)



Figura 3: Salina di Margherita di Savoia (BAT), la colorazione rossa è dovuta alla microalga *Dunaliella salina*



Figura 4: Salina "Conti Vecchi", Macchiareddu (Ca), sale nella vasca di precipitazione



Figura 5: Salina di Trapani

La scoperta della presenza di microplastiche nel sale per uso alimentare è molto recente in quanto i primi articoli scientifici sull'argomento sono del 2015 [Yang (2015)] [Yeager (2015)], ma da allora vi è un crescente interesse al problema delle microplastiche nel sale. Nel sale di miniera la presenza delle microplastiche è molto limitata e si ipotizza sia correlata all'inquinamento dovuto alle tecniche estrattive, in particolare alle particelle rilasciate dalle gomme dei veicoli impiegati. Il sale marino ha un contenuto di microplastiche variabile, ma molto più elevato di quello di miniera in quanto dipende dal contenuto di microplastiche dell'acqua di mare impiegata [Khuyen] [Sathish (2020)] [Gündoğdu (2018)]. Il processo di produzione del sale marino dovrebbe avere un effetto sulla contaminazione del sale con le microplastiche in quanto è ipotizzabile che l'aumento della densità delle acque nelle vasche di evaporazione impedisca la precipitazione delle microplastiche leggere, tranne quelle che vengano inglobate nei cristalli dei sali che precipitano prima del cloruro di sodio, tuttavia ciò non è stato ancora investigato. Il meccanismo di contaminazione del sale nelle vasche di precipitazione potrebbe essere simile: volumi elevati di cloruro di sodio precipitano inglobando le microplastiche e le sottraggono alle acque di scarico della salina. Il sale per uso alimentare può essere soggetto ad una raffinazione industriale per ridurre il contenuto di impurità come la sabbia, il solfato di calcio ed il solfato di magnesio, generalmente si tratta di un processo in cui il sale viene sciolto in acqua dando una soluzione satura e fatto riprecipitare in condizioni controllate [Rathnayaka (2013)]; anche se questo procedimento non è stato studiato per eliminare la contaminazione da microplastiche, potrebbe ridurre il contenuto.

Le microplastiche nel pulviscolo atmosferico

La presenza di microplastiche nel pulviscolo atmosferico è una scoperta recente, il primo articolo scientifico risale al 2015 [Dris (2015)], in seguito sono stati eseguiti una serie di studi sul pulviscolo atmosferico nell'aria delle grandi città come Parigi [Dris (2017)], Amburgo [Klein (2019)] e Shanghai [Liu, K. (2019) A]. Le microplastiche sono molto più dense dell'aria e tendono a precipitare sul suolo o sul mare [Horton (2018)], ma il loro bassissimo peso permette al vento di trasportarle per lunghe distanze, dando loro un comportamento simile a quello del pulviscolo atmosferico [(Allen 2019)]. La concentrazione e la deposizione di microplastiche sono influenzate da alcuni fattori come l'entità delle precipitazioni, la direzione e la velocità del vento, la densità e le forme degli edifici e la presenza di attività industriali [Chen & Feng 2020)]. Le condizioni meteorologiche sono significativamente correlate con la concentrazione di microplastiche nell'aria, in particolare è stata rilevata una riduzione della concentrazione di microplastiche nell'atmosfera dopo una precipitazione e la presenza di microplastiche nella pioggia di grandi città [Sang (2021)], inoltre è stato rilevato un aumento delle microplastiche nelle zone sottovento ai centri urbani [Abbasi (2019)]. L'origine delle microplastiche nel pulviscolo atmosferico è varia, ma si ipotizza che le maggiori fonti di microplastiche provengano dall'usura meccanica dei materiali polimerici o dalla loro lavorazione, in particolare dal consumo degli pneumatici [Kole (2017)] e dai processi meccanici di lavorazione della plastica e dei rifiuti plastici [Bianco (2020)]. Una serie di studi sulle particelle rilasciate dagli pneumatici durante il loro utilizzo hanno mostrato un'ampia variabilità delle dimensioni delle particelle prodotte, da 10 nm a 100 µm [Kreider (2010)] [Aatmeeyata (2009)] [Dahl (2006)] ed hanno stimato la produzione da 20 a 30 mg di micro e nanoparticelle per Km percorso da parte di uno pneumatico di un'automobile media [Milani (2004)] [Hillenbrand (2005)], veicoli più pesanti producono una maggior quantità di particelle. La lavorazione dei prodotti plastici può produrre microplastiche [Sridharan (2021)], anche se non vi sono dati consolidati sulle dimensioni ed i volumi emessi, in particolare nell'aria di ambienti di lavoro dove si macinano rifiuti plastici è stata rilevata la presenza di PM_{2.5} con concentrazioni anche 20 volte superiori a quelle di un ambiente urbano

[Buiarelli (2019)]. Il campionamento delle microplastiche può essere passivo, per precipitazione (tabella 5), dove spesso la concentrazione di microplastiche è espressa come numero di particelle precipitate su un m² in un giorno (n/m²/d) o attivo per filtrazione dell'aria (tabella 6), dove spesso la concentrazione è espressa in n di particelle per m³ di aria.

| Luogo del campionamento | Tipo di sito di campionamento | Caratteristiche microplastiche | Concentrazione | Fonte |
|------------------------------|--|--|---|-----------------------|
| Londra, UK | Tetto in città | Fibre 24 ± 10 µm Ø 400-500 µm lunghezza | 712± 162 n/m ² /d | Wright (2020) |
| Dongguan, Cina | Tetto in città | Fibre 0,2-2,2 mm | 208± 3 n/m ² /d | Cai (2017) |
| Dongguan, Cina | Centralina per il controllo ambientale | Fibre 0,2-2,2 mm | 277 ± 32 n/m ² /d | Cai (2017) |
| Dongguan, Cina | Tetto in città | Fibre 0,2-2,2 mm | 198 ± 27 n/m ² /d | Cai (2017) |
| Parigi, Francia | Tetto in città | Fibre 7-15 µm Ø 200-600 µm lunghezza | 110 ± 96 n/m ² /d | Dris et al. (2016) |
| Ho Chi Minh city, Vietnam | Centralina vicino ad una discarica | Fibre 0.1-1 mm, frammenti 0,1- 0,6 mm ² | 1300 stagione secca, 400 stagione delle piogge | Thinh (2020) |
| Amburgo, Germania | Tetto in città | Frammenti <63 µm | 136-512 n/m ² /d | Klein (2019) |

Tabella 5: microplastiche nell'aria campionate passivamente

| Luogo del campionamento | Tipo di sito di campionamento | Caratteristiche microplastiche | Concentrazione | Fonte |
|----------------------------|---|--|----------------------------------|----------------------|
| Shanghai, Cina | Tetto campus universitario | Fibre e frammenti 23-9555 μm | 1.42 ± 1.42 n/m ³ | Liu, C et al. (2019) |
| Camarillo, California, USA | Tetto campus universitario | Fibre 100-700 μm | 1.5 ± 1.1 n/m ³ | Gaston (2020) |
| Camarillo, California, USA | Biblioteca universitaria | Fibre 100-700 μm | 17.0 ± 3.8 n/m ³ | Gaston (2020) |
| Camarillo, California, USA | Laboratorio universitario | Fibre 100-700 μm | 3.0 ± 0.6 n/m ³ | Gaston (2020) |
| Nagpur, India | Tetto in città | PM ₁₀ | 4,8-1.6 n/m ³ | Narmadha (2020) |
| Roma, Italia | Tetto di città | PM _{2.5} 9.6 (7.1–13.0) $\mu\text{g m}^{-3}$ | | Buiarelli (2019) |
| | | PM ₁₀ 17.3 (12.1–25.3) $\mu\text{g m}^{-3}$ | | |
| Roma, Italia | Laboratorio universitario | PM _{2.5} 17.7 (11.5–30.0) $\mu\text{g m}^{-3}$ | | Buiarelli (2019) |
| | | PM ₁₀ 20.4 (13.0–33.0) $\mu\text{g m}^{-3}$ | | |
| Maccarese, Italia | Impianto di compostaggio | PM _{2.5} 229.8 (64.0–703.2) $\mu\text{g m}^{-3}$ | | Buiarelli (2019) |
| | | PM ₁₀ 295.2 (72.7–1406.2) $\mu\text{g m}^{-3}$ | | |
| Montalto di Castro, Italia | Impianto di riciclo dei rifiuti elettronici | PM _{2.5} 1674.4 (599.6–3077.9) $\mu\text{g m}^{-3}$ | | Buiarelli (2019) |
| | | PM ₁₀ 5066.8 (2309.7–9682.0) $\mu\text{g m}^{-3}$ | | |

Tabella 6: microplastiche nell'aria campionate attivamente

Le microplastiche nel corpo umano

La presenza di particelle plastiche nell'organismo umano è una delle più recenti scoperte che ha portato ad un maggior livello di attenzione il problema dell'inquinamento da plastica. Sono state trovate particelle plastiche in porzioni di colon [Ibrahim (2021)], tessuti polmonari [Amato-Lourenço (2021)] [Jenner (2022)], [Chen (2022)], fegato [Horvatits (2022)], reni, milza [Horvatits (2022)], nel sangue [Leslie (2022)] ed addirittura nella placenta [Ragusa (2021)] [Braun (2021)] [Zhu (2022)] e nel latte materno [Ragusa (2022)] (tabella 7).

| Tessuto/ secrezione (n. campioni) | concentrazione | Tipo e dimensioni | Polimeri principali | Riferimento |
|---|---|---|--------------------------------------|------------------------------|
| Colon (11) | 28.1 ± 15.4 particelle/g campione | Fibre 1.1 ± 0.3 mm | PA, PP, PC | Ibrahim (2021) |
| Polmone (20) | 31 particelle in 13 campioni | Frammenti 3.92 ± 0.67 µm | PP 35%, PET 24% | Amato- Lourenço (2021) |
| Polmone (13) | 39 particelle in 11 campioni | Fibre 49%, Frammenti 43% 12–2475 µm lunghezza, 4–88 µm larghezza | PP 23%, PET 18%, PE 10%, PS 8% | Jenner (2022) |
| Polmone (100) | 0.65 ± 0.70 particelle/campione | Fibre 1.45 ± 0.98 mm lunghezza, 35.74 ± 21.09 µm larghezza | PET | Chen (2022) |
| Fegato (11) | 4.6 particelle/grammo | Frammenti 5- 15 µm | PVC, PS, PET | Horvatits (2022) |
| Milza (3) | 1.1 particelle/grammo | Frammenti 5- 15 µm | PVC, PS, PET | Horvatits (2022) |
| Placenta (6) | 12 particelle in 4 campioni | Frammenti 5- 10 µm | PP | Ragusa (2021) |
| Placenta (2) | 3 particelle | Frammenti ~50 µm | PE, PS | Braun (2021) |

| | | | | |
|-----------------------|---------------------------------|--|--------------|------------------|
| Placenta (17) | 0.28 -9.55 particelle/g | Fibre e frammenti 20.34- 307.29 μm | PVC, PP, PET | Zhu (2022) |
| Sangue (22) | 1.6 $\mu\text{g/ml}$ | < 700 nm | PET PE PS | Leslie (2022) |
| Latte materno (34) | 58 particelle in 26 campioni | 2-12 μm | PE, PVC | Ragusa (2022) |

Tabella 7: microplastiche e nano plastiche nel corpo umano

Le particelle plastiche che entrano nell'organismo non possono uscire tramite le urine in quanto la filtrazione dei glomeruli renali per impedire il passaggio di macromolecole come le proteine, permette solo l'escrezione di particelle di diametro inferiore a 4,2 nm [Guyton (2006)], tuttavia nelle urine possono trovarsi dei marcatori dell'esposizione alle microplastiche. Le plastiche possono contenere degli additivi organici come i bisfenoli (antiossidanti), gli esteri dell'acido ftalico (plastificanti) e gli organobromuri (ritardanti di fiamma); l'assunzione di microplastiche può rilasciare nell'organismo queste sostanze, come è stato osservato in alcuni esperimenti con dei topi [Deng (2021)], ciò può spiegare la presenza di ftalati nell'organismo degli animali marini come i cetacei [Baini (2017)] [Fossi (2012)] e le tartarughe di mare [Savoca (2018)]. In passato la presenza di bisfenoli, ftalati ed organobromuri nell'organismo umano è stata legata principalmente all'esposizione professionale, come nell'industria della plastica [Dirven (1993)] [Ohlson (2000)] [Sjödén (1999)] ed è stato osservato che queste sostanze vengono eliminate con le urine [Meeker (2009)]; di conseguenza la loro presenza nell'organismo può essere correlata all'esposizione alle microplastiche, diventandone dei marcatori. La presenza dei vari esteri dell'acido ftalico nei prodotti plastici è ampiamente diffusa, dal suo uso classico nel PVC, dove può raggiungere il 17% della massa totale [Clausen (2022)], alle pellicole di PE per il confezionamento degli alimenti, dove il contenuto totale degli ftalati è stato quantificato da 1 a 30 mg/Kg [Liu, J. (2020)], inoltre è stato determinato un rilascio di ftalati dal PET utilizzato per confezionare alimenti [Giuliani (2020)]. Gli ftalati sono una famiglia di molecole organiche composta dagli esteri dell'acido ftalico, generalmente questo termine viene utilizzato per indicare gli specifici diesteri dell'acido ftalico che sono ampiamente

prodotti su scala industriale [Krauskopf (1993)]. Alcuni ftalati sono stati riconosciuti come dannosi per la salute umana, in particolare per l'apparato endocrino e l'apparato riproduttore (tabella 8), di conseguenza nell'Unione Europea sono stati stabiliti dei limiti alla loro presenza nei giocattoli ed altri prodotti per bambini [Directive 2005/84/EC]; vi sono anche dei limiti nell'uso degli ftalati per i prodotti plastici utilizzati per il confezionamento degli alimenti [Commission Regulation (EU) 10/2011].

| Nome | Abbreviazione | Distruttore endocrino? | Dannoso per l'apparato riproduttore? |
|---------------------------|---------------|------------------------|--------------------------------------|
| Dimetilftalato | DMP | No | No |
| Dietilftalato | DEP | In fase di valutazione | No |
| Dibutilftalato | DBP | Si | Si |
| Butil benzil ftalato | BBP | Si | Si |
| Dicicloesilftalato | DCHP | Si | Si |
| Dieptilftalato | DHP | No | Si |
| Di(2-etil esil)ftalato | DEHP | Si | Si |
| Dinonilftalato | DNP | No | No |
| Di(2-propil eptil)ftalato | DPHP | In fase di valutazione | No |
| Didecilftalato | DDP | No | No |

Tabella 8: gli esteri dell'acido ftalico maggiormente impiegati ed i loro effetti sull'uomo [ECHA]

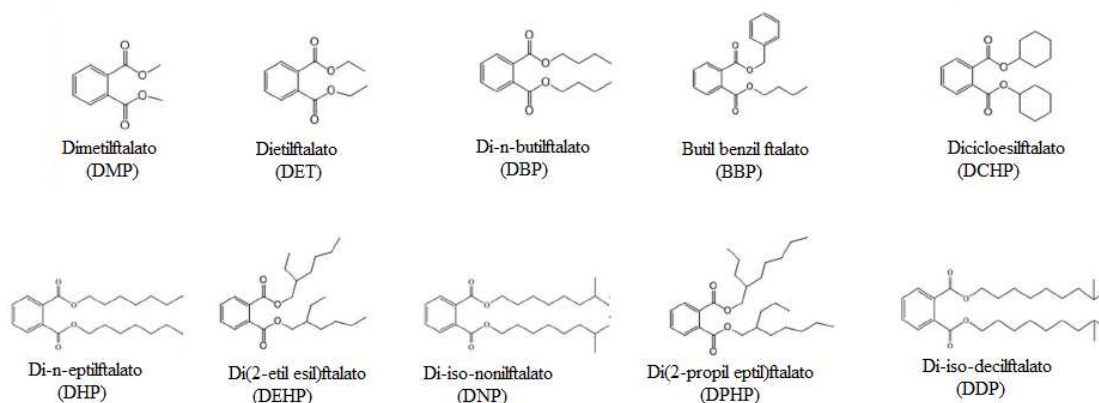


Figura 6: struttura degli ftalati maggiormente impiegati

Gli ftalati nell'organismo umano sono soggetti a vari destini [Frederiksen (2007)]: in parte vengono espulsi direttamente tramite le urine, in parte vengono parzialmente idrolizzati trasformandosi da diesteri a monoesteri dell'acido ftalico [Heindel (1992)]. I monoesteri

dell'acido ftalico sono parzialmente espulsi con le urine e parzialmente coniugati con l'acido glucuronico, tramite l'enzima uridina 5'-difosfo-glucuroniltransferasi ed espulsi tramite le urine come glucuronidi [Koch (2005)]. Questi processi enzimatici trasformano gli ftalati in molecole più idrofile e quindi più facilmente eliminabili con le urine [Silva (2003)], di conseguenza possono essere analizzati i metaboliti monoesteri per determinare l'esposizione dell'organismo agli ftalati: in particolare il monometilftalato (MMP) è il metabolita del DMP, il monoetilftalato (MEF) è il metabolita del DEP; molti studi analizzano separatamente il di-n-butilftalato (DnBF) ed il di-iso-butilftalato (DiBF) dai loro metaboliti, rispettivamente il mono-n-butilftalato (MBP) ed il mono-iso-butilftalato (MiBP). L'organismo umano metabolizza il DEHP dando vari metaboliti, i quali spesso non sono indicati singolarmente, ma complessivamente sotto la sigla MDEHP: metaboliti del di(2-etil esil)ftalato [Wang (2019)]. L'esposizione agli ftalati è stata riscontrata in molti studi che si sono svolti in molti paesi del mondo (tabella 9).

| Paese | Numero di soggetti | MMP | MEP | MBP | MiBP | MDEHP | Riferimento |
|----------------|--------------------|------|-------|-------|------|-------|----------------------|
| Arabia Saudita | 130 | 8,7 | 47,5 | 38,5 | 38,5 | 117,1 | Asimakopoulos (2016) |
| Australia | 2400 | 3,1 | 127 | 24,4 | 20,6 | 88,5 | Ramos (2016) |
| Brasile | 300 | 8,3 | 57,3 | 42,4 | 43,8 | 109,0 | Rocha (2017) |
| Cina | 183 | 14,6 | 22,1 | 63,5 | 57,1 | 76,1 | Guo (2011) |
| Corea | 60 | 10,0 | 13,4 | 16,7 | 4,5 | 43,6 | Guo & Wu (2011) |
| Francia | 279 | - | 43,5 | 35,7 | 53,7 | 58,6 | Zeman (2013) |
| Germania | 60 | 2,8 | 13,5 | 8,0 | 9,8 | 12,3 | Koch (2017) |
| Giappone | 35 | 18,2 | 16,4 | 17,7 | 7,5 | 35,1 | Guo & Wu (2011) |
| India | 22 | 8,6 | 150,0 | 13,0 | 18,3 | 77,9 | Guo & Wu (2011) |
| Italia | 74 | - | 73,2 | 41,2 | - | 15,2 | Tranfo (2013) |
| Kuwait | 22 | 10,1 | 411,0 | 113,0 | 54,1 | 180,4 | Guo & Wu (2011) |
| Malesia | 19 | 6,3 | 18,6 | 10,5 | 10,8 | 27,5 | Guo & Wu (2011) |
| Norvegia | 116 | | 55 | 32 | 31 | 39 | Sabaredzovic (2015) |
| Norvegia | 10 | 2,0 | 310,0 | 41,1 | 57,0 | 112,3 | Ye (2009) |
| Svezia | 38 | 1,2 | 35,0 | 46,0 | 16,0 | 35,0 | Högberg (2008) |
| USA | 96 | - | 232 | 37,5 | | 81,5 | Adibi (2008) |
| USA | 2350 | 1,8 | 194,4 | 20,7 | 3,7 | 73,0 | Colacino (2010) |

Tabella 9: concentrazione mediana in ng/mL dei metaboliti degli ftalati nelle urine

Gli effetti dell'esposizione alle microplastiche

L'inquinamento da rifiuti plastici ha iniziato ad essere fonte di forte preoccupazione a causa delle macroplastiche, la cui presenza nel mare causa danni ampiamente visibili: i detriti di plastica esteticamente sgradevoli che si depositano sulle coste e le spiagge influenzano negativamente l'industria del turismo [Gregory (1999)]. Le macroplastiche nel mare rappresentano un pericolo per gli animali di diverse specie, come pesci, tartarughe e uccelli, che le possono ingerire confondendole con il cibo o possono impigliarsi nei sacchetti di plastica e nelle reti abbandonate. Una volta ingerite, le macroplastiche possono non essere escrete e bloccare il sistema gastrointestinale dell'animale, oppure soffocarlo se ne ostruiscono le branchie o i polmoni [Barnes (2002)] [Colabuono (2009)] [Mrosovsky (2009)]. Questi effetti sono noti da tempo [Kenyon (1969)] [Cornelius (1975)] ed ampiamente documentati: le immagini di varie specie di tartarughe morte soffocate dalla plastica sono conosciute a livello mondiale dal grande pubblico.

L'inquinamento da microplastiche è stato scoperto recentemente ed i suoi effetti sono più subdoli di quelli da macroplastiche in quanto le microplastiche sono invisibili ad occhio nudo e sono incapaci di bloccare il sistema gastrointestinale o quello respiratorio degli animali, anche di piccoli crostacei [Hamer (2014)], che possono espellere le microplastiche ingerite, anche tramite le branchie mediante il flusso dell'acqua [Watts (2014)]. Poiché le microplastiche sono di dimensioni simili al plancton che costituisce la base della catena alimentare marina [Carbery (2018)], le microplastiche nelle acque vengono regolarmente ingerite da vari organismi: dai filtratori [Germanov (2018)] come i bivalvi ai crostacei ed i pesci [Moos (2012)]. In una serie di esperimenti è stato osservato che l'esposizione di alcuni animali marini a concentrazioni note di microplastiche ha prodotto delle conseguenze negative per alcuni di loro. Nello specifico è stato rilevato un aumento della mortalità [Aljaibachi (2018)] ed una riduzione del tasso di ingestione di cibo a seguito dell'“effetto riempimento” per l'azione meccanica esercitata sui recettori dell'apparato digerente, con conseguente calo di peso [Welden (2016)] per i crostacei esposti alle microplastiche, inoltre è stata osservata una riduzione del tasso di crescita nei bivalvi [Farrell (2013)]. Una diminuzione della fertilità e difetti anatomici nello sviluppo larvale sono stati registrati in

alcune specie della classe Echinoidea esposti alle microplastiche [Martínez-Gómez (2017)], mentre sono state osservate lesioni al tratto gastro-enterico dopo l'esposizione alle microplastiche del *Danio rerio*, un piccolo pesce [Lei (2018)]. Le cause di questi effetti non sono del tutto note, ma è stato osservato che parte delle microplastiche assunte da questi organismi non sono espulse, ma si accumulano nel tratto digestivo dall'animale [Wright (2013)], comportandosi come dei veri e propri corpi estranei provocando dei fenomeni infiammatori localizzati e conseguente alterazione delle attività biologiche, invece le nano plastiche possono spostarsi in altri tessuti attraverso le pareti cellulari dell'apparato digerente [Lu (2016)]. Le microplastiche e le nano plastiche assunte da un animale che non sono espulse non possono essere digerite dal medesimo poiché nessun animale dispone di enzimi che possono degradare i polimeri plastici [Andrady (2011)]. Queste particelle bloccate nell'organismo possono trasferirsi facilmente tra i gruppi trofici, sia all'interno che tra gli ecosistemi attraverso la predazione [Cuthbert (2019)]. Un altro rischio legato all'assunzione delle microplastiche deriva dalla presenza degli additivi delle plastiche e per alcuni tipi di plastica dalla presenza di tracce dei monomeri utilizzati per la produzione dei polimeri come il cloruro di vinile nel PVC, il bisfenolo A nei policarbonati e lo stirene nel polistirene, che possono essere presenti nel polimero finale a causa di una polimerizzazione incompleta [Sajiki (2003)]. È noto che diversi additivi impiegati nella produzione dei materiali plastici posseggono un elevato e riconosciuto potere tossico sia per l'uomo che per gli animali con effetti cancerogeni, neuro-tossici e interferenti endocrini [Hahladakis (2018)]. Ad esempio un estere dell'acido ftalico, il di(2-etil esil)ftalato (DEHP) ha anche dimostrato di avere un impatto sull'apparato riproduttivo del pesce zebra (*Danio rerio*), influenzando negativamente l'oogenesi e lo sviluppo dell'embrione e portando a una significativa riduzione della fecondità complessiva [Carnevali (2010)]. È stato osservato che le sostanze chimiche presenti nei frammenti plastici possono essere trasferite ai tessuti degli organismi viventi una volta ingerite [Hartmann (2017)] e, a causa della biomagnificazione, queste sostanze potrebbero accumularsi in quantitativi crescenti aumentando il rischio degli effetti tossici soprattutto per gli animali all'apice della piramide alimentare [Browne (2013)] [Koelmans (2016)]. Un altro pericolo per gli organismi marini dovuto al consumo di

microplastiche deriva dalla possibilità che esse agiscano come veicolo di contaminanti assorbiti dalla plastica durante la permanenza nell'ambiente [Barletta (2019)]. L'acqua di mare contiene, tipicamente a livelli estremamente bassi, una grande varietà di inquinanti organici persistenti (POPs), come gli idrocarburi policiclici aromatici (IPA), bifenili policlorurati (PCB) ed eteri di difenile polibromurato (PBDE) [Lee (2014)] [Mato 2001)] provenienti da insetticidi, pesticidi e prodotti chimici industriali che entrano nel mare attraverso le acque reflue e il deflusso [Wurl (2004)]. Queste molecole apolari hanno un'elevata tendenza ad essere adsorbite da particelle fortemente idrofobe, come le plastiche, che presentano un'alta superficie specifica [Teuten (2007)] [Wang (2016)] ed un'idrofobicità superficiale maggiore rispetto alla materia organica sospesa presente in natura [Eek (2010)]. Sono stati identificati vari POPs nelle microplastiche marine [Hirai (2011)] [Rios (2007)], che si comportano quindi da spazzini e trasportatori [Bakir (2014)]; alcuni autori hanno anche dimostrato la capacità delle microplastiche di assorbire metalli pesanti, compresi il mercurio, cadmio e piombo [Eagles-Smith (2018)], ma anche alluminio, cromo, manganese, ferro, cobalto, nickel e zinco [Rochman (2014)] [Endo (2005)] [Bakir (2012)] [Rios-Mendoza (2013)]. Il rilascio di questi inquinanti dalle microplastiche agli organismi che le hanno assunte è un processo difficile da studiare, in quanto è collegato alle sollecitazioni che l'organismo e più specificamente il suo apparato digerente infligge alla particolare particella di un polimero parzialmente degradato e ciò crea problemi nell'impostare uno studio di laboratorio [Lambert (2017)] e controversie sulla sua valutazione nella letteratura scientifica [Lohmann (2017)]. In un articolo è stato ipotizzato che l'esposizione di un organismo contaminato da POPs a microplastiche pulite possa "ripulire" l'organismo [Gouin (2011)], in uno studio si è osservato un danno maggiore per gli organismi esposti a microplastiche contaminate con IPA rispetto a quelli esposti a microplastiche pulite [Rochman (2013)], un altro studio ha osservato che delle microparticelle di polistirene contaminate con i PCB hanno trasportato il contaminante in alcuni nematodi, anche se in piccole quantità [Besseling (2013)], mentre altri studi non hanno mostrato nessun trasporto significativo di PCB e bisfenolo A negli organismi marini tramite microplastiche contaminate [Koelmans (2013)] [Koelmans (2014)]. Tutte queste

evidenze indicano che in natura diverse specie di animali, compresi quelli destinati al consumo umano, possono essere influenzate negativamente dalla presenza di microplastiche, anche se i dati sulla presenza di microplastiche negli alimenti non sono ancora sufficienti, i relativi livelli di esposizione sono in gran parte sconosciuti ed i potenziali effetti sui consumatori sono poco chiariti [Barboza (2018)] [EFSA (2016)].

Gli effetti sull'uomo

La diffusione delle microplastiche nei livelli trofici e nell'ecosistema in cui viviamo porta all'inevitabile esposizione umana a questo nuovo inquinante. Uno dei pochi studi che ha valutato l'esposizione media complessiva alle microplastiche è arrivato a stimare il quantitativo di microplastiche pro-capite ingerite a 39.000-52.000 particelle all'anno, di cui la maggioranza proveniente dal pulviscolo atmosferico che respiriamo, mentre le maggiori fonti alimentari sono i prodotti ittici e l'acqua in bottiglia [Cox (2019)]. Questa stima è molto generica ed è stata ricavata moltiplicando la concentrazione media di microplastiche nell'aria, nell'acqua in bottiglia ed in alcuni alimenti per il loro consumo medio; gli alimenti considerati sono: sale, miele, zucchero, prodotti ittici ed alcolici. Gli effetti delle microplastiche sull'uomo sono stati studiati recentemente [Revel (2018)] ed in maniera limitata a causa dei vincoli etici, dalle rigorose misure di sicurezza per la manipolazione di campioni umani e dalle tecniche di rilevamento delle microplastiche ancora poco sviluppate. Inizialmente gli studi erano rivolti al comprendere gli effetti delle micro e nano particelle plastiche rilasciate dalle protesi mediche e gli effetti di alcuni additivi delle plastiche, più recentemente sono iniziati gli studi sulle microplastiche assunte tramite gli alimenti ed il pulviscolo atmosferico. Le microplastiche ingerite dall'uomo possono agire localmente o trasferirsi, causando l'esposizione di tessuti distanti. Vari studi hanno osservato il passaggio delle microplastiche di dimensioni inferiori a 150 μm attraverso le giunzioni cellulari della parete gastrica ed intestinale; è stato notato che questo processo è più probabile durante un'inflammatione intestinale e nei casi di malnutrizione o diete ricche di grassi saturi e zuccheri ad alto contenuto di fruttosio, probabilmente a causa della maggiore permeabilità delle barriere epiteliali dovuti ai cambiamenti nel microbioma intestinale [West-Eberhard

(2019)]. Gli studi sul passaggio delle microplastiche attraverso l'apparato digerente umano hanno ipotizzato che soltanto una percentuale molto bassa, minore dello 0.3%, potrebbe essere assorbita, in quanto la maggior parte delle microplastiche viene eliminata con le feci, inoltre soltanto le particelle di dimensioni minori di 20 μm sarebbero in grado di penetrare in profondità nello stomaco e nell'intestino e soltanto quelle di dimensioni inferiori a 10 μm sarebbero in grado di penetrare in altri organi, come fegato e muscoli e di superare la barriera emato-encefalica e placentare [Browne (2008)] [Efsa (2016)] [Galloway (2015)] [Prata (2020)]. Gli effetti dell'esposizione alle microplastiche non sono stati provati, ma solo ipotizzati sulla base dell'esposizione alle microplastiche di varie colture cellulari ed alcune cavie da laboratorio. Un effetto dell'esposizione alle microplastiche che è stato generalmente osservato è lo stress ossidativo, che potrebbe essere causato dall'interazione con la cellula della superficie della particella, le cui molecole di polimero sono parzialmente ossidate per la degradazione. Questa interazione può causare una risposta infiammatoria, con la conseguente produzione di specie reattive dell'ossigeno, come perossidi e radicali, che non riuscendo a degradare la particella possono danneggiare la cellula [Kelly (2012)] [Valavanidis (2013)]. Questo meccanismo può avvenire anche all'interno delle cellule nel caso di contaminazione con nanoplastiche che riescono a penetrare la membrana cellulare [Geiser (2005)], con il risultato di avere un effetto tossico per il citoplasma cellulare [Furukuma (2016)] [Schirinzi (2017)]. Gli effetti di questi meccanismi di infiammazione sui vari organi sono ancora in fase di studio, in particolare sono state trovate microplastiche in alcune porzioni del colon e dei polmoni che sono state asportate a causa di un tumore, ma non è chiaro se siano state le microplastiche a causare il tumore o se vi si siano accumulate per la deformazione della parte di organo causata dal tumore [Ibrahim (2021)] [Chen (2022)]. In un esperimento, dei topi sono stati esposti alle microplastiche e si è riscontrata una diminuzione del metabolismo dei lipidi [Deng (2017)]. La possibilità che le microplastiche e le nanoplastiche possano scatenare una reazione infiammatoria ha portato ad ipotizzare dei loro effetti sull'organismo umano, che attualmente si stanno investigando, ma su cui non ci sono ancora certezze. Questi effetti riguarderebbero un aumento della coagulabilità del sangue [Canesi (2015)], una maggiore attività degli osteoclasti, le cellule

responsabili del riassorbimento osseo, con perdita ossea [Ormsby (2016)] ed interferenze con il sistema immunitario [Farhat (2011)] [Wright (2017)]. Valutare l'esposizione umana agli inquinanti adsorbiti alle microplastiche è complesso, in quanto la dose effettivamente assorbita dipende fortemente dai tipi di particelle ingerite, dal loro tempo di eliminazione, dalla velocità di rilascio oltre che dalla quantità di contaminante assunta; si tratta di uno studio ulteriormente complicato dal fatto che le microplastiche sono particelle parzialmente degradate e di cui è complesso determinare il rilascio di contaminati, soprattutto in un apparato digerente come quello umano caratterizzato da varie fasi digestive con differenti pH ed enzimi. Secondo alcuni studi la diretta esposizione umana agli inquinanti sarebbe molto ridotta, mentre i rischi maggiori legati alla contaminazione delle microplastiche deriverebbero dalla contaminazione della base della catena alimentare, di cui l'uomo è al vertice e che quindi la biomagnificazione riguarderebbe solo i contaminanti e non le microplastiche [Koelmans (2013)] [GESAMP (2016)] [Bakir (2016)]. Tuttavia, considerati i pochi studi a riguardo, l'incertezza e la difficoltà di comparazione dei risultati derivante dall'assenza di protocolli analitici standardizzati, la comunità scientifica presta parecchia attenzione ai pericoli associati al consumo di alimenti contaminati con microplastiche [Rainieri (2019)].

La normativa sulle microplastiche

Negli ultimi anni, l'inquinamento marino da plastica è diventato un importante argomento di attualità ed ora ha assunto grande importanza per le comunità e a livello scientifico. I risultati di un sondaggio in 15 paesi dell'Unione Europea hanno messo in evidenza che la cittadinanza è sempre più preoccupata per gli effetti dell'inquinamento da plastica sugli ecosistemi marini e sulla salute pubblica e sostiene la necessità di ulteriori ricerche in questo settore [Davison (2021)]. La tendenza internazionale è quella di regolamentare e limitare la presenza di microplastiche nell'ambiente e negli alimenti. Sono state prese alcune iniziative in questa direzione e diversi stati hanno deciso di limitare l'uso e la distribuzione delle microplastiche primarie. Gli USA, ad esempio, hanno vietato la produzione di prodotti cosmetici contenenti microplastiche a partire da luglio 2018 vietandone completamente la

vendita entro la fine del 2019 [Microbead-Free Waters Act (2015)]. L'unione europea ha iniziato ad occuparsi del problema delle microplastiche nel 2018 con una comunicazione della strategia europea per la plastica nell'economia circolare [EUR-Lex - 52018DC0028], nel 2019 un report dell'agenzia europea per i prodotti chimici (ECHA) ha suggerito di vietare l'uso di microplastiche nei cosmetici, nei detersivi e nei fertilizzanti, dove sono impiegate per modulare il rilascio dei nutrienti nel terreno [ECHA (2019)]. Nel 2020 è stato pubblicato uno studio sugli impatti sociali ed economici conseguenti al divieto di uso delle microplastiche nei cosmetici, nei detersivi e nei fertilizzanti [ECHA (2020)], ma non c'è ancora una legge europea contro la produzione o la vendita di prodotti contenenti microplastiche, anche se si potrebbe fare riferimento al Reg. (CE) 178/02 per quanto riguarda la presenza di corpi estranei negli alimenti o alla Direttiva 2008/56/CE in materia di rifiuti marini. Le microplastiche sono però riconosciute a livello comunitario come indice dello stato ambientale delle acque marine e gli stati membri sono tenuti a stabilire dei valori soglia nelle acque [Commissione Europea (2017)]. In Italia è in discussione il disegno di legge N. 2582 il cui articolo 9 vieterebbe la vendita di prodotti cosmetici da risciacquo ad azione esfoliante o detersivo contenenti microplastiche [DDL 2582]. La pressione dell'opinione pubblica ha spinto alcune aziende a rinunciare ad utilizzare la plastica nei prodotti monouso, inoltre sono iniziate varie campagne per vietare l'uso di particelle di plastica micro-dimensionate nei cosmetici a livello globale [Anagnosti (2021)].

Metodi di analisi delle microplastiche

L'analisi delle micro e nano plastiche è un ambito della ricerca scientifica molto recente ed ancora in via di sviluppo, che non dispone ancora di metodi e procedure standardizzate generalmente accettate dalla comunità scientifica [Eerkes-Medrano (2015)]. L'uso di diversi intervalli di grandezza per definire le microplastiche ed i vari metodi utilizzati per la loro analisi rendono difficile la comparabilità tra gli studi [Hanvey (2017)] ed evidenziano la necessità di sviluppare un metodo semplice ed a basso costo per l'analisi delle microplastiche che possa fungere da riferimento [Galgani (2013)]. Esistono due protocolli per l'analisi delle microplastiche in particolari ambienti: le acque ed i sedimenti, questi protocolli sono stati sviluppati da un gruppo di ricerca congiunto dell'Unione Europea [MSFD (2013)] ed il dipartimento per il commercio degli Stati Uniti d'America [NOAA (2015)]. I metodi utilizzati nella ricerca scientifica per analizzare le microplastiche comprendono varie operazioni che si possono dividere in tre fasi: campionamento, pretrattamento del campione ed analisi; le matrici che vengono analizzate sono: acqua, suolo, aria, alimenti e prodotti. Il campionamento ed il pretrattamento del campione sono le fasi che variano maggiormente in funzione della matrice che si vuole analizzare, il loro risultato è la deposizione delle microplastiche su di un supporto, dove possono essere analizzate.

Il campionamento

Le acque superficiali vengono spesso campionate utilizzando reti da traino a manta, un tipo di reti utilizzate per la raccolta del neuston, le particelle galleggianti o sospese a pochi centimetri di profondità, che raccolgono le particelle di un certo intervallo di grandezza mentre vengono trainate da un'imbarcazione [Fischer (2016)]. Un altro metodo di campionamento per le acque, che può essere impiegato per prelevarla a vari livelli di profondità utilizza un sistema che aspira e filtra l'acqua; per campionare piccoli volumi o eseguire campionamenti particolari, o per acque molto sporche che otturerebbero rapidamente il filtro si raccoglie l'acqua in dei contenitori di vetro per filtrarla

successivamente [Hidalgo-Ruz et al. 2012]. Nel caso si debba campionare l'acqua che passa in una tubatura, che sia un acquedotto o uno scarico, generalmente si fa passare una piccola parte del flusso in un tubo laterale collegato ad un filtro ed un misuratore di flusso [Rasmussen (2021)]. Il pulviscolo atmosferico può essere raccolto passivamente per deposizione in un apparato di raccolta che può essere semplicemente composto da un imbuto posto sopra una beuta ed esposto nell'ambiente da campionare: al termine del campionamento l'apparato viene lavato con un'acqua milliQ precedentemente filtrata e le acque di lavaggio con il particolato sono filtrate [Zhang (2020)]. Il campionamento attivo del particolato atmosferico può avvenire semplicemente con una pompa per l'aria calibrata collegata ad un filtro, ma uno studio è arrivato a sviluppare un manichino che simula la respirazione umana per valutare l'esposizione alle microplastiche in un ambiente [Vianello (2019)]; un altro metodo prevede l'impiego di un impattatore multistadio che permette di campionare il pulviscolo dell'intervallo di grandezza desiderato [Chen & Fu (2020)]. Il campionamento delle microplastiche nei terreni viene generalmente effettuato tramite il carotaggio, ma nei terreni sabbiosi, specialmente le spiagge, si può anche raccogliere un determinato volume di sabbia e passarlo per una serie di setacci, anche se si tratta in un metodo utilizzato principalmente per campionare le particelle di dimensioni superiori a 0,5 mm [Thomas (2020)]. Il campionamento dei sedimenti posti sott'acqua può essere effettuato con dei carotaggi, anche se più complicati di quelli nel terreno [Corcoran (2015)], ma se si vuole campionare solo il livello superficiale del fondale si può impiegare una piccola benna per raccogliere il terreno [Castañeda (2014)]. I campioni di terreno raccolti devono subire un pretrattamento prima dell'analisi. Il campionamento delle matrici alimentari è legato al tipo di alimento: alimenti liquidi, ad esempio le bevande e le acque minerali, possono essere filtrate direttamente, mentre alimenti solubili come sale, zucchero e miele possono essere sciolti con un'acqua milliQ precedentemente filtrata e le loro soluzioni filtrate. Per gli alimenti non solubili, come pesci e crostacei si preleva una certa quantità di tessuto dell'animale, che deve subire un pretrattamento prima dell'analisi. [Cole (2014)] [Qiu (2016)].

Il pretrattamento del campione

I campioni in cui si cercano le microplastiche possono contenere composti organici biodegradabili e silicati di varie dimensioni, le tecniche di pretrattamento del campione servono a rimuovere questi interferenti e facilitare l'analisi; il pretrattamento del campione aggiunge dei passaggi ulteriori del metodo di analisi e può aumentare il rischio di contaminazioni e di perdite di microplastiche nel campione [Cutroneo (2020)]. Non tutti i tipi di campioni richiedono un pretrattamento, soprattutto quelli più "pulite" come l'aria e l'acqua potabile, al contrario vi sono dei campioni che richiedono obbligatoriamente un pretrattamento, come i campioni di terreno ed i tessuti animali. La presenza di composti organici biodegradabili nei campioni può interferire con alcune tecniche di analisi, oltre a poter intrappolare le particelle microplastiche e renderle difficilmente identificabili con la microscopia [Alfonso (2021)]. Per questi motivi si opera una digestione del campione, che non deve essere troppo aggressiva per evitare di degradare le microplastiche parzialmente ossidate. Sono disponibili numerosi metodi per la rimozione chimica della materia organica, che utilizzano diversi reagenti come: il perossido di idrogeno, l'acido solforico [Haap (2019)], l'acido cloridrico [Nuelle (2014)], l'acido nitrico [Claessens (2013)]; [Avio (2015)] l'idrossido di sodio [Foekema (2013)], e l'impiego di proteasi per una digestione enzimatica [Cole (2014)]. L'impiego delle basi forti ed acidi forti è sconsigliato per un'analisi generica in quanto possono degradare le particelle di poliesteri, policarbonati e poliuretani; per campioni a basso contenuto di composti organici biodegradabili si utilizza maggiormente il perossido di idrogeno, [Mathalon (2014)], in particolare la maggior parte degli studi hanno utilizzato una concentrazione del 30% di H_2O_2 per ottenere una discreta efficacia di digestione e minimi effetti sui più importanti polimeri plastici. Alcuni studi utilizzano una soluzione di perossido di idrogeno con una piccola quantità di solfato di ferro (reattivo di Fenton) per velocizzare la reazione [Tagg (2017)], mentre per i campioni alimentari si tende ad utilizzare la digestione enzimatica. Alcuni autori hanno dimostrato l'efficacia di alcuni enzimi, come la tripsina e la proteina chinasi-K nella digestione della materia organica [Courtene-Jones (2017)], gli enzimi, diversamente dai composti chimici, non hanno alcun effetto nei confronti dei polimeri plastici ed il loro utilizzo è molto meno pericoloso, ma

richiede il controllo della temperatura e del pH del campione in modo che gli enzimi si attivino ed operino al meglio. [Stock (2019)]. Un altro importante contaminante del campione è costituito dalla presenza di particelle di silicati di dimensioni paragonabili a quelle delle microplastiche che possono essere confuse con le particelle plastiche o addirittura coprirle impedendone l'analisi, inoltre per le loro dimensioni possono facilmente otturare i filtri durante la filtrazione del campione [Zobkov (2017)]. La quantità di particelle silicee dipende dalla natura del campione in quanto è massimo nei campioni di terreno e basso nei campioni di acqua potabile, mentre è variabile per i campioni di sale. Per rimuovere le sabbie e le argille dai campioni si sfrutta la loro diversa densità rispetto alle plastiche: il campione è posto in una soluzione filtrata di cloruro di sodio ($\rho \approx 1,2 \text{ g cm}^{-3}$) [Syakti (2017)], di ioduro di sodio ($\rho \approx 1,8 \text{ g cm}^{-3}$) [Dekiff (2014)], di politungstato di sodio ($\rho \approx 1,7 \text{ g cm}^{-3}$) [Quinn (2017)] o di cloruro di zinco ($\rho \approx 1,8 \text{ g cm}^{-3}$) [Mintenig (2020)]. L'uso del cloruro di sodio impedisce di estrarre le plastiche più pesanti come il PET ($\rho \approx 1,8 \text{ g cm}^{-3}$) ed il PVC ($\rho \approx 1,8 \text{ g cm}^{-3}$) [MatWeb], il politungstato di sodio può formare cristalli che rimangono bloccati nel filtro, mentre il cloruro di zinco è corrosivo e va smaltito appropriatamente [Liebezeit (2012)] [Claessens (2013)]. Il campione in soluzione può essere agitato e lasciato a riposo in modo che le microplastiche galleggino ed il residuo minerale precipiti, un altro metodo più veloce prevede la centrifugazione del campione, in ogni caso il surnatante viene filtrato. [Thompson (2004)] [Rocha-Santos (2015)] Questo metodo, quando viene applicato correttamente può ridurre fortemente la presenza delle particelle di sabbia ed argilla nel campione, ma non completamente.

L'analisi delle microplastiche

L'analisi delle microplastiche riguarda le microplastiche che sono state trattenute dai filtri dopo l'eventuale pretrattamento dei campioni e la loro filtrazione, questi filtri dovrebbero essere di fibra di vetro non legata oppure di metallo per evitare interferenze con le analisi, ma in vari articoli scientifici sono utilizzati i filtri in acetato di cellulosa. Il diametro dei pori dei filtri dovrebbe consentire una filtrazione dei campioni rapida, evitando che un gran

numero di residui rimangano sulla superficie e coprano le particelle, ma tanto più piccolo è il diametro tanto maggiore sarà la possibilità di trattenere un numero elevato di particelle, evitando una sottostima delle microplastiche eventualmente presenti. In pochi articoli la filtrazione dei campioni avviene a cascata, con due filtri in linea dal diametro dei pori decrescente [Simon (2018)] [Stock (2019)], mentre in altri articoli si effettua una prima filtrazione con un filtro, generalmente in metallo con fori da 1 - 0,5 mm per raccogliere le particelle “grandi” come le grandi microplastiche e preservare il “vero” filtro con fori da 50 – 1 μm dall’intasamento [Van Cauwenberghe (2013)]. Il processo di filtrazione è quasi sempre velocizzato con l’uso di una pompa da vuoto. Nella maggior parte degli studi le microplastiche vengono prima identificate visivamente sui filtri attraverso uno stereomicroscopio, [Mathalon (2014)] [Bellas (2016)] [Devriese (2015)] questo approccio non consente di identificare con certezza la natura plastica dei frammenti, ma permette una prima selezione delle potenziali microplastiche. La qualità dell’esame visivo è influenzata dall’esperienza dell’osservatore, dalle dimensioni e dal tipo di frammenti e dall’ingrandimento del microscopio [Wesch (2016)], di conseguenza l’incertezza che ne deriva aumenta al diminuire delle dimensioni delle particelle. Le piccole particelle sferoidali sono problematiche in quanto frequentemente si confondono con le particelle di carbone e di sabbia con microplastiche e viceversa; un altro problema della microscopia ottica è la difficoltà ad osservare le microplastiche trasparenti [Wang (2016)], ma alcune soluzioni parziali a questo problema possono essere: l’uso di filtri metallici (scuri) per migliorare il contrasto rispetto ai filtri in fibra di vetro (bianchi) [Frère (2016)], l’impiego di un microscopio a luce polarizzata o di uno stereomicroscopio o di un microscopio a fluorescenza [Syakti (2017)]. Un metodo per migliorare l’identificazione delle microplastiche al microscopio prevede l’uso di un colorante apolare che si legghi alle microplastiche e le evidenzi rispetto alle particelle inorganiche; spesso in questi ambiti viene impiegato il Rosso Nilo, un colorante fluorescente e l’osservazione delle microplastiche avviene utilizzando un microscopio a fluorescenza. Utilizzando la giusta quantità di colorante si possono addirittura osservare differenze dell’intensità della colorazione dei polimeri in base alla loro idrofobicità e distinguere PE e PP da PET e PA [Maes (2017)]. Un

altro metodo per evidenziare le microplastiche su un filtro prevede l'uso del Rosa Bengala, un colorante idrofilo che non si lega alle particelle polimeriche e che le può evidenziare per contrasto rispetto al filtro ed alle particelle inorganiche tramite l'impiego di un microscopio a fluorescenza [Kosuth (2018)]. La microscopia ottica permette di identificare delle particelle come probabili microplastiche anche dalla forma, ma nel caso di frammenti di dimensioni inferiori a 10 μm è molto difficile determinare se si tratti di particelle polimeriche o minerali, per questo motivo si può impiegare la microscopia elettronica. La microscopia elettronica fornisce ulteriori informazioni sulle caratteristiche morfologiche delle particelle di plastica, tipicamente le particelle vengono analizzate con un microscopio elettronico a scansione (SEM) accoppiato con il rilevamento a raggi X (SEM-EDS) per determinare la composizione elementare delle particelle e distinguere le particelle silicee e quelle carboniose [Eriksen (2013)]. L'impiego di questa tecnica richiede che il campione sia depositato su un apposito filtro metallico e che sia ricoperto con un sottilissimo rivestimento metallico [McCormick (2014)]. Per ottenere la conferma definitiva della natura polimerica di una particella e determinare il tipo di polimero generalmente si impiegano la spettroscopia infrarossa e la spettroscopia Raman. La spettroscopia infrarossa si applica in trasformata di Fourier (FT-IR), le particelle più grandi ($>500 \mu\text{m}$), possono essere prelevate singolarmente e inserite in un'unità di riflessione trasversale attenuata (ATR), un accessorio degli spettroscopi FT-IR, [Tagg (2015)] [(Zbyszewski (2011))]. Le particelle più piccole sono più complesse da analizzare e richiedono un microscopio abbinato ad uno FT-IR con una sorgente di emissione molto piccola (micro-FT-IR), le particelle non possono essere analizzate se una delle loro tre dimensioni è inferiore ai 20 μm a causa del limite di diffrazione delle lunghezze d'onda impiegate ($4000\text{-}500 \text{ cm}^{-1}$), si tratta di un limite problematico nel caso delle fibre, che possono essere lunghe centinaia di micron ma larghe una decina [Xu (2019)]. Il micro-FT-IR non può essere utilizzato sui filtri, le particelle da analizzare vanno trasferite su un apposito supporto. Alcuni strumenti micro-FT-IR possono operare su un'intera superficie con la modalità imaging: eseguono una scansione completa in un'area e sono utili per analizzare un gran numero di particelle, tuttavia richiedono lunghi tempi ed un'elaborazione dei dati complessa [Primpke (2017)], in questi è utile depositare

le particelle sul supporto per l'analisi tramite l'evaporazione di un'aliquota del campione in sospensione di un solvente polare non aggressivo [Vianello (2013)]. Un'altra tecnica analitica ampiamente utilizzata nell'analisi delle microplastiche è la spettroscopia Raman abbinata ad un microscopio, la tecnica consiste nel colpire il campione con un raggio laser e rilevare la piccola frazione di radiazione emessa dal campione per diffusione anelastica e che quindi abbia una lunghezza d'onda diversa da quella incidente, lo scattering Raman. La spettroscopia Raman dà risultati complementari rispetto alla spettroscopia infrarossa: è più sensibile ai legami omopolari dello scheletro carbonioso della molecola rispetto ai legami eteropolari dei gruppi funzionali, all'opposto della spettroscopia infrarossa. [Edwards (1993)]. La spettroscopia Raman è molto utile per analizzare le microplastiche: può operare con particelle grandi anche solo 10 μm , l'analisi può avvenire anche sul filtro dove si sono state depositate senza ulteriori trattamenti e non è necessario rimuovere totalmente l'acqua dal campione [Schymanski (2018)]; i problemi di questa tecnica sono legati alle elevate interferenze all'analisi del polimero da parte degli eventuali coloranti ed al rischio che si possa bruciare la particella di plastica che si sta analizzando [Lenz (2015)]. La spettroscopia Raman può essere impiegata per un particolare imaging: le analisi non sono svolte su ogni punto dell'area in quanto verrebbe totalmente bruciato il campione, ma su alcuni punti dell'area dove sono presenti le particelle, scelti manualmente o con l'ausilio di un software [Luo (2022)]. La spettroscopia FTIR e la Raman consentono di ottenere uno spettro di ciascuna particella analizzata che viene confrontato con una serie di spettri di riferimento specifici di certi materiali plastici, permettendone quindi una corretta e attendibile identificazione; queste tecniche consentono anche di calcolare le dimensioni delle particelle analizzate [Rocha-Santos (2015)]. Un problema che affligge entrambe le tecniche è la difficoltà di analizzare gli spettri delle particelle parzialmente degradate, i cui spettri sono complicati ed hanno un basso grado di accordo con quelli degli standard [Lee (2021)]. Un altro modo per le analisi delle microplastiche e dei composti organici ad essi assorbiti utilizza un pirolizzatore abbinato ad un gascromatografo con spettrometro di massa (Pyr-GC/MS) e si basa sull'analisi dei vapori provenienti dalla pirolisi dei polimeri e l'evaporazione degli additivi e dei contaminati organici presenti nel polimero [Fries (2013)].

L'analisi con il Pyr-GC-MS dà i migliori risultati quando si utilizza un pirolizzatore a punto di Curie, che evita una pirolisi eccessiva ed uno spettrometro di massa con sorgente EI ed un rilevatore a triplo quadrupolo [Hermsen (2018)]. Si tratta di un metodo distruttivo, che impedisce qualsiasi ulteriore analisi delle particelle di plastica e che non consente di determinare il numero, le dimensioni e la forma delle particelle; il vantaggio principale di questa tecnica è che permette di analizzare contemporaneamente tutte le micro e le nano particelle presenti nel campione e di quantificarne la massa totale [Fischer (2017)]. Le microplastiche di dimensioni maggiori di circa 0,1 mm possono essere prelevate dal filtro ed inserite direttamente nello strumento per un'analisi specifica della particella, le altre particelle di dimensioni inferiori sono tutte analizzate contemporaneamente sul filtro [Schirinzi (2019)]. In alcuni articoli scientifici le microplastiche sono analizzate con la termogravimetria (TGA) per determinare il tipo di polimero, si tratta di un'analisi che non richiede una particolare preparazione del campione, ma è una tratta di una tecnica distruttiva che richiede degli standard di riferimento molto precisi ed è applicabile solo per una particella alla volta e solo per particelle più grandi di 0,5 mm. Nel caso di microplastiche di dimensioni sufficientemente grandi da poter essere divise, questa tecnica è stata abbinata alla calorimetria differenziale a scansione che consente di dare una conferma sull'identificazione del polimero [Peñalver (2020)] [Becker (2020)]. Un aspetto poco indagato delle microplastiche sono le loro distribuzioni di masse molecolari, si tratta di un tipo di analisi distruttiva che viene svolta per una singola particella alla volta, di dimensioni superiori a circa 1 mm e di cui si conosca il tipo di polimero. L'analisi viene svolta tramite cromatografia a permeazione di gel (GPC) dopo che la microplastica è stata sciolta in un opportuno solvente ed il metodo deve essere calibrato per il polimero specifico [Hintersteiner (2015)].

Prevenzione della contaminazione e qualità dell'analisi

La contaminazione dei campioni durante l'analisi in laboratorio da parte di microplastiche esogene è una eventualità frequente ed ampiamente documentata in quanto le microplastiche sono ubiquitarie [Torre (2016)]; di conseguenza il metodo di analisi deve necessariamente comprendere un protocollo per minimizzare la contaminazione e per quantificare la contaminazione residua. Un'importante fonte di contaminazione è rappresentata dalle microfibre plastiche presenti nell'aria [Davison (2011)], per questo motivo, tutte le fasi dell'analisi in cui il campione o i reagenti non sono in un contenitore chiuso, devono avvenire in un ambiente a contaminazione controllata con a fianco un filtro esposto all'ambiente che andrà osservato al microscopio per cercare tracce di particelle contaminanti. Le analisi delle microplastiche andrebbero svolte in cappe a flusso laminare di classe II e non in cappe chimiche ad aspirazione per evitare l'ingresso delle microplastiche nell'ambiente di lavoro; in alternativa si possono svolgere le attività che non comportano la produzione di vapori, l'uso di solventi volatili o reagenti pericolosi a cappa spenta [Wesch (2017)]. La pulizia della vetreria di laboratorio è importante per evitare le contaminazioni, in alcuni studi la si pone per ore in muffole a 500°C per incenerire le microplastiche che non sono state eliminate con i lavaggi [Liu, F. (2019)], inoltre la vetreria viene spesso ricoperta da fogli di alluminio per evitare che si contaminino dopo la pulizia [Foekema (2013)]. Un'importante fonte di fibre plastiche è rappresentata dai vestiti degli operatori, pertanto è suggerito di indossare vestiti al 100% in fibra naturale, come il cotone, per mitigare il rischio di contaminazione [Vandermeersch (2015)]. Tutti i reagenti impiegati dovrebbero essere in soluzione in modo da poterli filtrare ed evitare contaminazioni ed anche l'acqua milliQ impiegata per i lavaggi va filtrata. Per valutare la contaminazione complessiva del protocollo di analisi si possono effettuare dei bianchi [Hermsen (2017)], mentre per valutare le eventuali perdite del metodo si possono arricchire i campioni con delle microplastiche, come microsferi di un colore specifico, che essendo nuove possono essere facilmente distinte dalle microplastiche originarie del campione e che permettono di determinare i recuperi del metodo [Davidson (2016)]. Gli standard possono essere ottenuti macinando alle dovute dimensioni della plastica colorata del polimero da analizzare ed

invecchiandoli con il “weatherometer”, uno strumento che usa acqua calda e radiazioni UV per simulare l’esposizione atmosferica [Cai (2019)]. Per un protocollo di analisi di qualità bisogna ridurre il più possibile l’arbitrarietà dell’operatore e nel caso si usi uno spettroscopio FT-IR o Raman prediligere l’imaging all’analisi di alcune particelle “significant”, inoltre quando si opera con degli spettri bisogna utilizzare un programma che si occupi del confronto e del riconoscimento degli spettri rispetto agli standard e che dia un indice di qualità (hit quality index) al riconoscimento [Renner (2019)].

II Parte sperimentale

L'Analisi del sale

I campioni di sale

L'analisi delle microplastiche nel sale è stata effettuata su 13 tipi di sale, in modo da poter testare il metodo di analisi su un ampio spettro di condizioni reali, caratterizzate da campioni altamente puri e campioni contenenti interferenti come sabbia, argilla o addirittura ossido ferrico. Sono stati scelti principalmente i sali grossi in quanto il procedimento di macinazione può alterare le microplastiche del prodotto (tabella 10).

| Sigla | Nome del sale | Luogo d'origine | Fonte | Uso |
|-------|---------------------------------|----------------------------|-------------|--|
| S1 | Carlo Erba, fino | Milano | Industriale | Laboratorio, qualità tecnica |
| S2 | Emilio Cadelano, grosso | Macchiareddu (Ca) | Salina | Alimentare |
| S3 | Sigma-Aldrich, fino | Germania | Industriale | Laboratorio, >99,5% |
| S4 | Sale grosso | Trapani (TP) | Salina | Alimentare |
| S5 | Culligan, grosso | USA | Industriale | Resine a scambio ionico per addolcitori dell'acqua |
| S6 | Chantesel, grosso | Margherita di Savoia (BAT) | Salina | Alimentare |
| S7 | Mothia, grosso | San Pantaleo (TP) | Salina | Alimentare |
| S8 | VWR, fino | USA | Industriale | Laboratorio, qualità analitica >99,9% |
| S9 | Sosalt, grosso | Trapani (TP) | Salina | Alimentare |
| S10 | Sale rosa dell'Himalaya, grosso | Khewra, Pakistan | Miniera | Alimentare |
| S11 | Sale grigio, grosso | Guérande, Francia | Salina | Alimentare |
| S12 | Fior di sale, grosso | Arles, Francia | Salina | Alimentare |
| S13 | Conad, grosso | Petralia soprana (Pa) | Miniera | Alimentare |

Tabella 10: lista dei campioni di sale analizzati

I campioni di sale S1, S3 ed S8 sono dei reagenti da laboratorio, prodotti ad alta purezza chimica, ma confezionati in contenitori di plastica, inoltre il saggio di purezza a cui sono stati sottoposti non considera la valutazione delle microplastiche. Il campione S5 è un sale caratterizzato da un'alta purezza (>99,5%) ed a bassissimo contenuto di cationi metallici diversi dal sodio, in grado di avvelenare le resine scambiatrici di ioni per cui è impiegato. I campioni S2, S4, S6, S7 ed S9 sono sali provenienti da varie saline italiane che non hanno subito un trattamento di raffinazione dopo la raccolta e sono caratterizzati da un discreto contenuto di sabbia. Il campione S 10 è un famoso sale di miniera caratterizzato dalla presenza di Fe_2O_3 , da cui deriva il suo colore rosa, il campione S11 è un particolare tipo di sale di salina definito come sale bretone o sale celtico e caratterizzato da un discreto contenuto di argille. Il sale S12 deriva dallo strato più superficiale del sale di salina ed è stato raccolto ed imbustato prima della sua totale disidratazione, dando un prodotto caratterizzato da un bassissimo contenuto di sabbia ed una discreta quantità di acqua; il sale S13 è un comune sale di miniera. I campioni di sale S4 ed S13 provengono da confezioni di cartone, tutti gli altri da confezioni plastiche.

La prevenzione della contaminazione

La grande varietà di tipi sale ha reso complesso lo sviluppo di un protocollo di analisi delle microplastiche ed ha richiesto una serie di test per ogni operazione svolta, al fine di valutarne l'applicabilità per ogni campione. Il primo problema che si è affrontato è stato quello del rischio di contaminazione: le microplastiche sono dei contaminanti ubiquitari ed una loro presenza nell'ambiente di analisi può portare ad un errore sul contenuto di microplastiche nel campione, per questo motivo è stato sviluppato un protocollo per ridurre e quantificare le contaminazioni esterne. Il protocollo per la prevenzione e la quantificazione delle microplastiche è stato sviluppato a partire dall'identificazione delle sorgenti di contaminazione da microplastiche che sono state individuate nei reagenti impiegati, nello

spazio fisico dove avviene l'analisi e nell'operatore che esegue le analisi. Per prevenire la contaminazione da parte dei reagenti liquidi, questi sono stati filtrati con un filtro in fibra di vetro non legato (Millipore, con pori da 2,5 μm), mentre non sono stati impiegati nelle analisi reagenti solidi o gassosi. La prevenzione della contaminazione dell'area di analisi è risultata complessa: la maggior parte delle attività sono state svolte sotto una cappa chimica Köttermann, precedentemente pulita e quando sono state effettuate analisi al di fuori della cappa il trasporto dei campioni è avvenuto in scatole di alluminio pulite o in essiccatori in vetro, inoltre tutti i contenitori utilizzati nelle analisi sono stati puliti attentamente prima del loro utilizzo. Per ridurre la contaminazione dei campioni da parte dell'operatore, quest'ultimo ha impiegato un camice da laboratorio in cotone e non ha toccato direttamente i campioni, ma solo i loro contenitori ed ha utilizzato spatole metalliche pulite per il travaso. Un filtro Whatman 42 (fascia blu, diametro 55 mm) è stato esposto sotto la cappa durante tutto il periodo di lavorazione ed analisi di un campione e successivamente osservato al microscopio per quantificare l'eventuale contaminazione esterna. Non sono state considerate le contaminazioni provenienti dal contenitore originale del sale per motivi metodologici: in questo studio sono stati analizzate le microplastiche nei prodotti, non le fonti delle microplastiche nei prodotti.

Il pretrattamento dei campioni

Il metodo di analisi che è stato sviluppato per questo studio è diviso in due parti: nella prima il campione di sale viene sciolto in acqua e successivamente la soluzione viene filtrata, trasferendo le microplastiche dal sale al filtro, nella seconda fase avvengono le varie analisi delle microplastiche sul filtro. La prima fase è molto delicata in quanto influenza tutte le analisi della seconda fase e per questa ragione sono state effettuate una serie di prove per ottenere il miglior risultato. Prima di iniziare con le analisi sono state attuate due scelte sul tipo di risultato da ottenere: l'unità di misura con cui riportare le microplastiche e la definizione da utilizzare per riconoscere le microplastiche. Innanzitutto si è deciso di

riportare i risultati in $\text{mm}^2/100 \text{ g}$, a differenza di molta letteratura scientifica che riporta i risultati come numero di particelle/Kg o mg di polimero/Kg; questa scelta è un compromesso tra un risultato che potrebbe confondere sull'effettiva quantità di microplastiche nel campione ed un risultato che richiederebbe l'identificazione del tipo di polimero per ogni microplastica ed una sua stima di volume e densità, un problema complicato per la natura delle microplastiche che molto raramente sono microsfele di polimero puro, ma molto spesso sono fibre e particelle irregolari. In questo studio abbiamo considerato come microplastiche le particelle più lunghe di $50 \mu\text{m}$ e più larghe di $5 \mu\text{m}$ in quanto le particelle più piccole sono facilmente confondibili con le particelle minerali sul filtro. Le prime prove di analisi hanno riguardato la quantità di sale ed il volume d'acqua da impiegare. Il volume di sale impiegato in un'analisi è correlato al numero di microplastiche e di interferenti, generalmente particelle di sabbia, che si troveranno sul filtro, una quantità di sale eccessiva rende difficoltosa la filtrazione a causa dell'ostruzione generalizzata dei pori e problematica l'identificazione delle microplastiche in quanto il filtro è ricoperto dagli interferenti. Se si impiega una quantità di sale troppo piccola le microplastiche trovate non saranno rappresentative dell'intero campione ed il risultato non sarà replicabile. In molti articoli della letteratura scientifica si utilizzano 200-250 g di sale, ma anche un complesso pretrattamento del campione; in questo studio sono stati utilizzati solo 100 g di sale che sono stati semplicemente sciolti in acqua. Il volume di acqua impiegato deve essere sufficiente a solubilizzare l'intero campione di sale, i volumi d'acqua in eccesso hanno l'unico effetto di allungare i tempi della filtrazione; tutti i campioni sono stati sciolti in 500 ml di acqua distillata. La filtrazione è un'altra operazione delicata dell'analisi, per ridurre al minimo le contaminazioni è stato impiegato un sistema filtrante in vetro Merck Millipore XX1004722 (figura 7) con un gooch di porosità $40\text{-}60 \mu\text{m}$ come supporto per il filtro, l'apparato è stato collegato ad una bottiglia in vetro con rubinetto da cui la soluzione salina fluiva lentamente; per velocizzare la filtrazione è stata impiegata una pompa da vuoto a membrana KNF Neuberger N.813.3ANE.



Figura 7: sistema filtrante, la soluzione fluisce dalla bottiglia alla beuta da vuoto passando per il filtro alla base del “bicchiere”

Sono state effettuate una serie di prove con vari tipi di filtri per massimizzare la cattura delle microplastiche e ridurre i tempi di analisi. La prima prova è stata effettuata con un filtro Whatman 42 (fascia blu), di cellulosa con diametro di 55 mm e diametro dei pori di 2,5 μm , quindi con il filtro S&S (fascia nera) di cellulosa con diametro 55 mm e diametro dei pori 12-24 μm ed infine con il filtro in fibra di vetro non legato Millipore 47 mm di diametro e con pori da 2,5 μm . Due campioni di sale sono particolarmente problematici: il sale S10 ha un elevato contenuto di ossido ferrico (figura 8) ed il sale S11 ha un elevato contenuto di sabbia ed argilla (figura 9); dei campioni di questi due sali sono stati sottoposti a test aggiuntivi per favorirne la filtrazione. Sono state fatte tre prove con il sale S10, con tre differenti soluzioni: tre campioni di 100g di sale sono stati sciolti rispettivamente in 250 ml di una soluzione acquosa di acido etilendiamminotetraacetico (EDTA) 0,05 M (Carlo Erba), 250 ml di una soluzione acquosa di sodio esametafosfato (Sigma-Aldrich, CAS R. N. 10124-

56-8) 0,05 M e 250 ml di una soluzione di acido ossalico 0,05 M (Carlo Erba); i campioni sono stati tenuti sotto agitazione per 3 ore, lasciati decantare per 3 ore, quindi il surnatante è stato pompato lentamente (3 ml/min) con una pompa peristaltica Econopump Bio-Rand nella bottiglia per l'analisi. Questi test sono stati effettuati con l'obiettivo di ridurre il contenuto di ferro nel campione da filtrare tramite dei chelanti. Un campione di 100 g di sale S11 è stato sciolto in 250 ml di acqua, quindi è stato tenuto sotto agitazione (300 giri/min, 50°C), in seguito la miscela è stata lasciata a decantare per 90 minuti a temperatura ambiente ed infine il surnatante è stato pompato lentamente (3 ml/min) nella bottiglia per l'analisi. Questa prova è stata effettuata per ridurre il contenuto di sabbia ed argilla del campione.



Figura 8: Sale rosa dell'Himalaya (S10)



Figura 9: Sale grigio (S11)

La microscopia ottica

I filtri sono stati osservati con il microscopio Motic BA200 equipaggiato con la fotocamera OMAX A3530U (3.2 Megapixel), ogni particella che per forma o colore sembrasse una microplastica è stata fotografata e l'immagine elaborata con i software Toupview ed ImageJ per determinare le dimensioni della particella. L'analisi al microscopio ottico permette di determinare l'area ed il colore delle microparticelle, questi dati consentono di distinguere le particelle in probabili microplastiche (figura 10) ed in probabili particelle non plastiche (figura 11). Le dimensioni delle particelle sono riportate come area.



Figura 10: una probabile microplastica



Figura 11: una probabile particella minerale

I risultati della microscopia ottica

Sono state effettuate varie prove di filtrazione dei campioni di sale sciolti in acqua, in particolare il campione di sale S1 è stato filtrato con il filtro di fascia blu, con il filtro di fascia nera e con il filtro in fibra di vetro. I tempi di queste tre filtrazioni sono stati molto diversi, anche se si è impiegata la stessa quantità di sale e di acqua: la completa filtrazione con il filtro di fascia blu ha richiesto circa cinque ore, quella con il filtro di fascia nera circa due ore, mentre quella con il filtro in fibra di vetro poco più di tre quarti d'ora. La differenza di tempo di filtrazione tra il filtro di fascia blu e quello di fascia nera può essere facilmente

spiegata con la differente dimensione dei pori dei due filtri, mentre la maggior velocità del filtro in fibra di vetro potrebbe essere legata alla sua maggior resistenza alla deformazione sotto pressione rispetto ai filtri in fibra di cellulosa; questa proprietà impedirebbe alle particelle di dimensioni superiori a quelle dei pori di entrare nel filtro e rimanervi incastrate riducendone permanentemente il flusso. La procedura di analisi di un sale (S1) è stata eseguita con tre filtri diversi: il filtro a fascia blu, il filtro a fascia nera ed il filtro in fibra di vetro; l'analisi al microscopio ottico ha permesso di identificare delle particelle sui filtri come probabili microplastiche. Sommando le aree di tutte le probabili microplastiche di un filtro è stato ottenuto un valore simile tra il filtro di fascia blu ($0,418 \text{ mm}^2$) ed il filtro di fascia nera ($0,422 \text{ mm}^2$) mentre è stata trovata un'area quasi doppia sul filtro in fibra di vetro ($0,849 \text{ mm}^2$) (grafico 3).

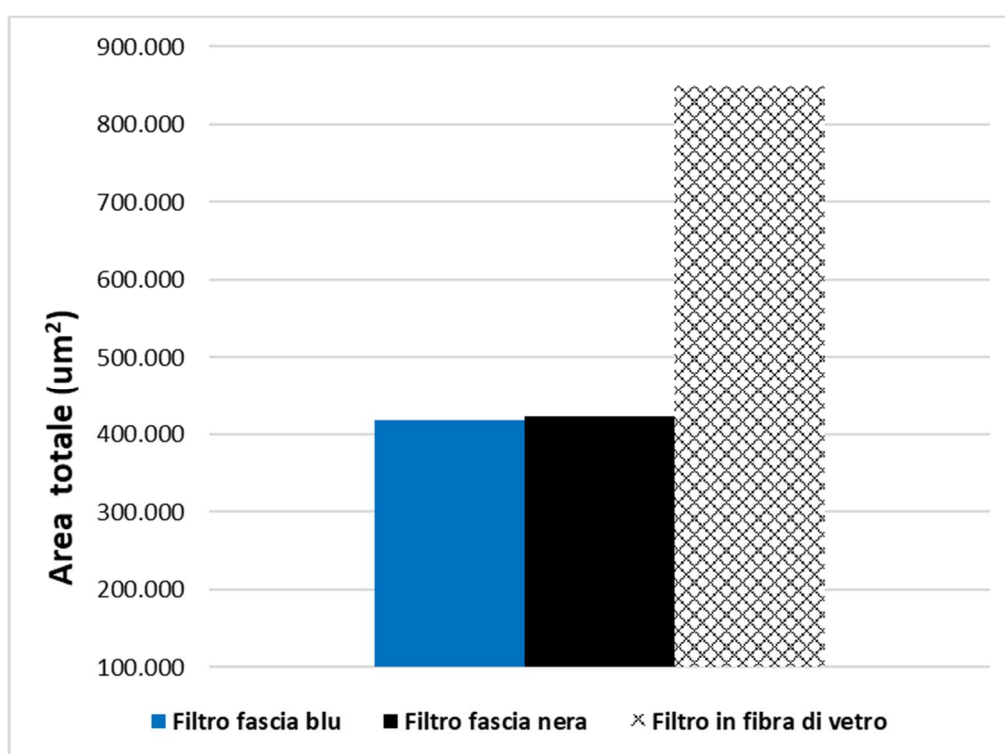


Grafico 3: area di tutte le probabili microplastiche trovate nel sale S1 con i tre diversi filtri

Le particelle identificate come probabili microplastiche sui tre filtri utilizzati nell'analisi del sale S1 sono state suddivise in base alle loro dimensioni in cinque gruppi di intervalli di

grandezza: le particelle di area compresa tra 100 e 10000 μm^2 , quelle di area compresa tra 10000 e 20000 μm^2 , quelle di area compresa tra 20000 e 30000 μm^2 , quelle di area compresa tra 30000 e 40000 μm^2 e le poche particelle di area superiore a 40000 μm^2 . Le particelle di area inferiore a 100 μm^2 non sono state considerate in quanto è molto difficile determinare se siano particelle plastiche o minerali. La somma delle aree di tutte le particelle nei vari gruppi mostra che il filtro in fibra di vetro riesce a trattenere le particelle in quantità superiore agli altri due filtri (grafico 4), in particolare nel gruppo delle particelle più piccole, il gruppo più numeroso (grafico 5).

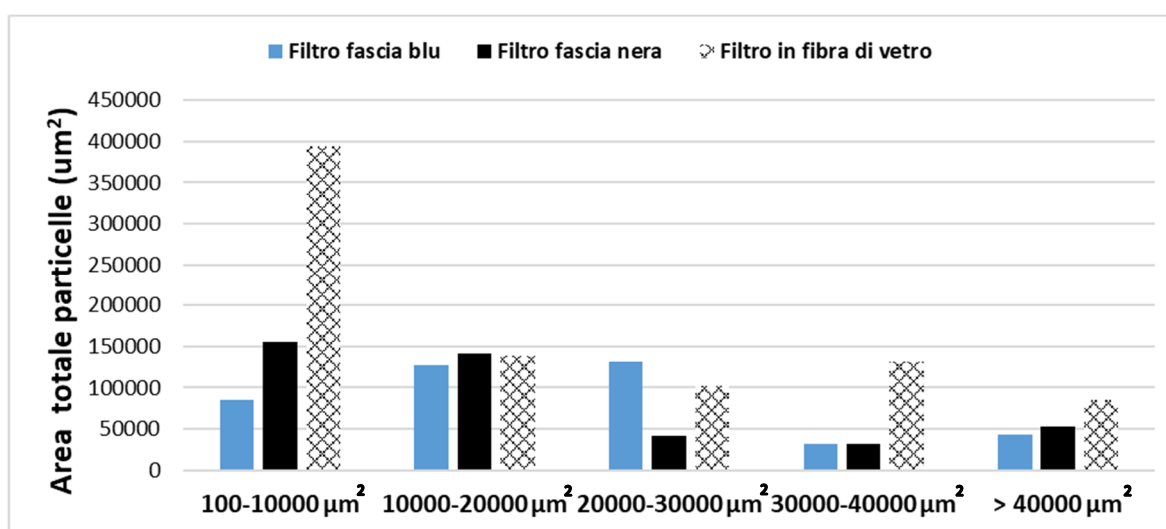


Grafico 4: area totale delle probabili microplastiche divise per dimensioni delle particelle, sale S1

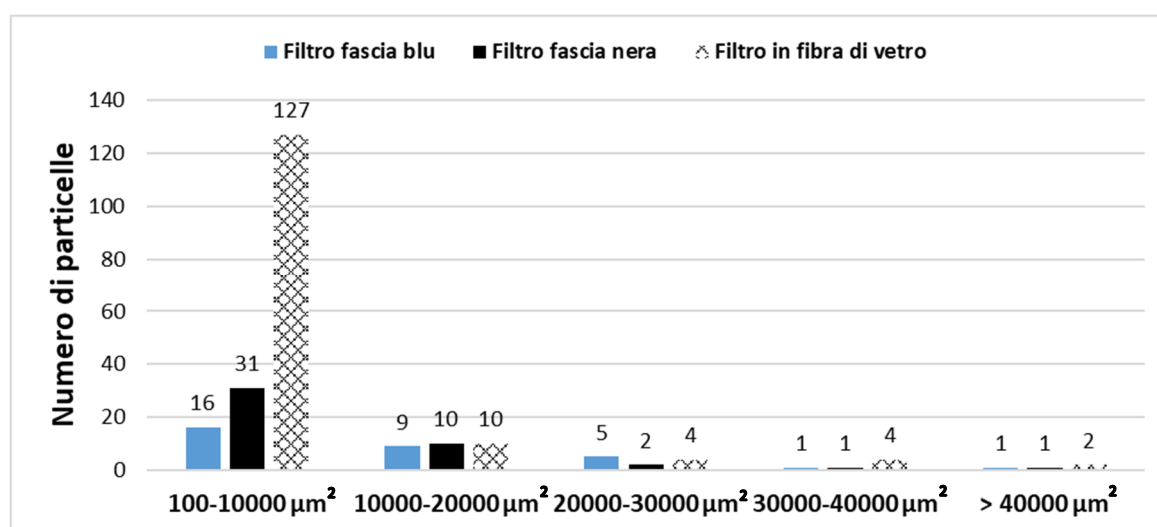


Grafico 5: numero di probabili microplastiche divise per dimensioni delle particelle, sale S1

Dati i migliori risultati ottenuti con il filtro in fibra di vetro, tutti gli altri sali sono stati analizzati con lo stesso filtro; l'analisi del sale S10 ha prodotto un filtro non analizzabile a causa del deposito rosso di ossido ferrico (figura 12) e non è stato possibile concludere la filtrazione del sale S11 a causa dell'elevato contenuto di sabbia ed argilla che ha otturato il filtro (figura 13).



Figura 12: filtro del campione S10



Figura 13: filtro del campione S11

Per questi due campioni di sale si è utilizzato rispettivamente il metodo di chelazione dello ione Fe^{+3} con acido ossalico ed il metodo della decantazione. I risultati delle analisi dei campioni di sale sono stati riportati come area totale delle probabili microplastiche (grafico 6) e mostrano una sostanziale differenza tra i campioni di sale marino (S2, S4, S6, S7, S9, S11 e S12) e quelli del sale di miniera (S13 e S10) in quanto i primi contengono un maggior quantità, espressa come superficie (mm^2), di probabili microplastiche. Il sale con il più alto contenuto di microplastiche è il sale grigio (S11). I quattro campioni di sale industriale analizzato (S1, S3, S5 e S8) contengono quantità molto variabili di probabili microplastiche: il cloruro di sodio di grado tecnico (S1) ed il sale per resine ioniche (S5) mostrano un contenuto di microplastiche paragonabile a quello del sale marino, mentre i due campioni

di cloruro di sodio di grado analitico (S3 e S8) hanno il minor contenuto di microplastiche tra tutti i campioni analizzati.

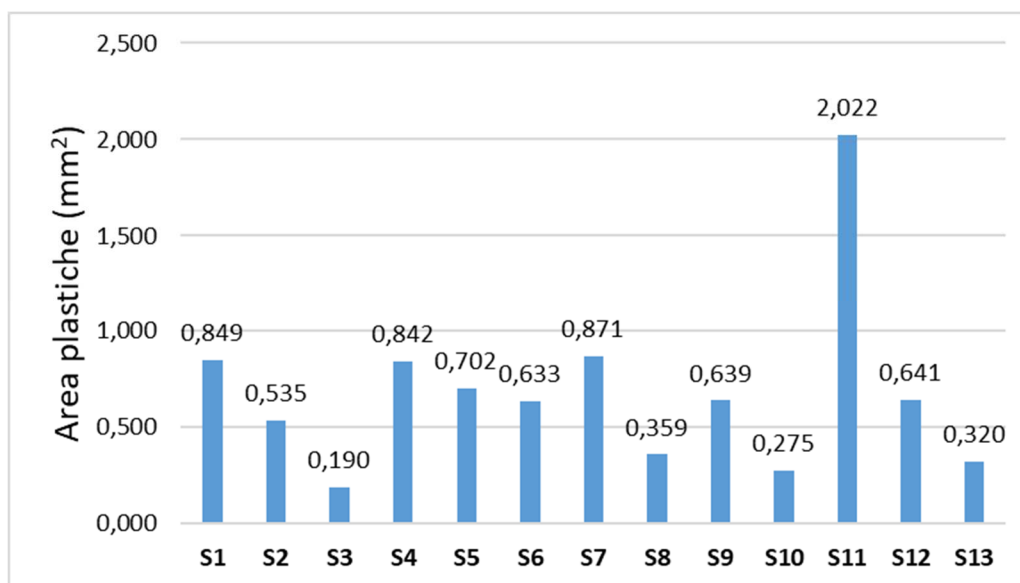


Grafico 6: area totale delle probabili microplastiche

Le microplastiche sono state divise per dimensioni in cinque classi e per ogni campione di sale è stata determinata la loro percentuale in area rispetto all'area totale delle particelle (grafico 7). In tutti i campioni la maggioranza delle particelle è di dimensioni comprese tra i 10 ed i 10000 μm^2 , i campioni di cloruro di sodio di grado analitico (S3 e S8) hanno la percentuale maggiore di microplastiche più piccole, mentre il maggior contenuto di microplastiche di maggiori dimensioni si ha nel sale rosa dell'Himalaya (S 10).

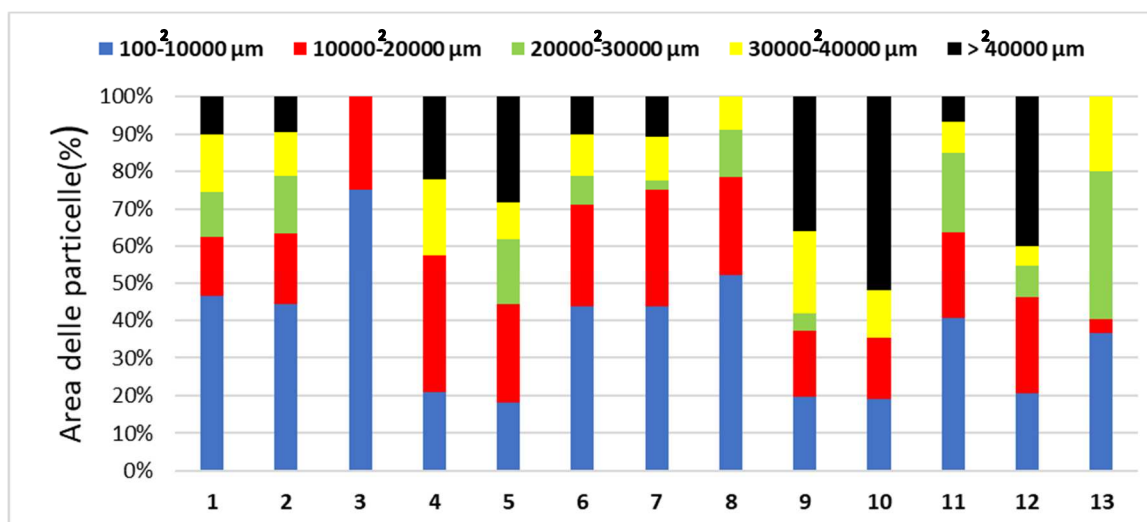


Grafico 7: percentuale di area delle particelle raggruppate per classe dimensionale

L'area di tutte le microplastiche presenti in un campione è correlata al numero di microplastiche nel campione (grafico 8) tuttavia vi sono delle eccezioni dovute alle differenti dimensioni delle particelle: il campione S6 contiene un numero maggiore di particelle rispetto al campione S5, ma l'area totale delle particelle contenute nel campione S5 è maggiore di quella del campione S6; la stessa eccezione avviene tra i campioni S8 ed S9. Per questo motivo si è scelto utilizzare come unità di misura delle microplastiche la superficie totale delle microplastiche piuttosto che il loro numero.

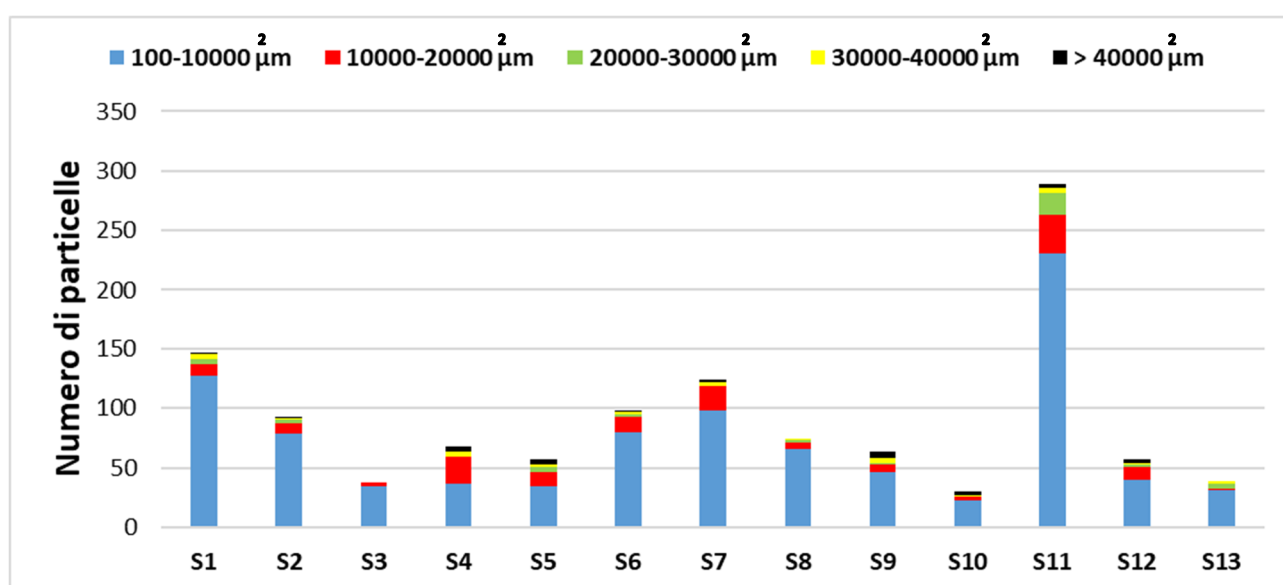


Grafico 8: numero di particelle per classe dimensionale

L'impiego del rigoroso protocollo per la protezione del campione non ha portato ad osservare particelle di dimensioni superiori a 100 μm nei filtri posti sotto la cappa chimica in cui si sono svolte le analisi. I tempi delle analisi sono molto lunghi in quanto alcune filtrazioni sono durate più di cinque ore e nel caso del campione di sale S11 l'analisi è durata quasi sette ore. La ricerca delle microplastiche sui filtri è la maggior fonte di errore dell'analisi, in quanto è facile scambiare determinate particelle minerali per microplastiche, l'errore di misura della particella è stato fortemente ridotto a circa 5 μm^2 calibrando il microscopio ottico con un vetrino (calibration slide, Motic) ed eseguendo l'analisi delle aree

delle particelle con il software ImageJ. La stragrande maggioranza delle microplastiche osservate sui filtri è di tre colori: blu, rosso e nero (grafico 9).

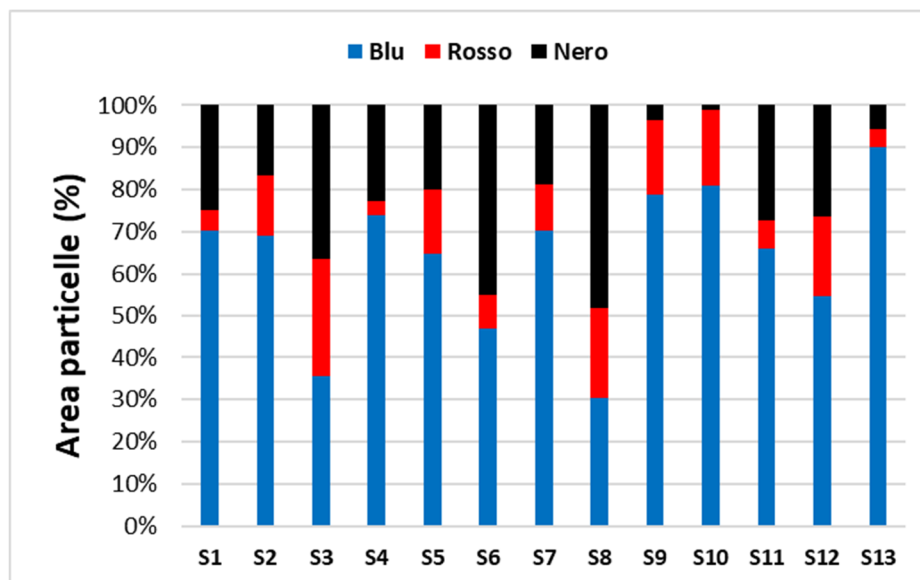


Grafico 9: area totale delle particelle su un filtro in fibra di vetro divise per colore

La spettroscopia Raman

Alcune particelle significative sono state analizzate direttamente sopra i filtri in fibra di vetro con la spettroscopia Raman, questa analisi è stata effettuata con lo spettroscopio micro-Raman Horiba Jobin-Yvon HR-Evolution tramite il software LabSpec 6, queste analisi sono state eseguite grazie alla collaborazione del prof. Postorino del dipartimento di fisica (Università La Sapienza). Le condizioni di analisi sono state ottimizzate utilizzando un obiettivo 20X ed una sorgente laser rossa (633 nm), inoltre è stato analizzato solo lo spettro di emissione a lunghezze d'onda superiori a quella di eccitazione (Stokes shift) in quanto di intensità superiore rispetto allo spettro di emissione a lunghezze d'onda inferiori a quella di eccitazione (anti-Stokes shift). L'impiego di una sorgente laser su una microplastica per decine di secondi può degradare la microplastica, ma lo spettroscopio Raman utilizzato può richiedere anche 40 secondi per eseguire un'analisi dell'intero spettro (shift 20-3600 cm^{-1})

che sia confrontabile con uno spettro di riferimento in quanto lo strumento analizza una frazione dello spettro alla volta. Dopo varie prove, il compromesso scelto tra le varie esigenze, prevede un'analisi di 5 secondi ripetuta 60 volte solo per due frazioni specifiche dello spettro di emissione (shift 720-1800 cm^{-1} e 2450-3300 cm^{-1}); queste frazioni dello spettro Raman sono state scelte dopo l'analisi dei campioni di polimeri riferimento in modo da includere i picchi significativi che permettono l'identificazione del polimero. Come polimeri di riferimento per l'analisi Raman sono stati scelti il Nylon 66 (poliammide), il polietilene tereftalato (PET), il polipropilene (PP), il polistirene (PS), il polietilene (PE), il Teflon (politetrafluoroetilene), il PMMA (polimetilmetacrilato), la gomma NBR (copolimero butadiene acrilonitrile) ed il TCA (triacetato di cellulosa, biodegradabile).

| Polimero | Picchi significativi (shift 720-1800 cm^{-1}) | | | | | Picchi significativi (shift 2450-3300 cm^{-1}) | | | |
|----------|---|------|------|------|------|--|------|------|------|
| Nylon 66 | 1000 | 1128 | 1305 | 1443 | 1639 | 2876 | 2912 | 3075 | |
| PET | 833 | 1143 | 1344 | 1453 | 1617 | 2491 | 2880 | | |
| PP | 809 | 975 | 1040 | 1331 | 1459 | 2725 | 2839 | 2883 | 2951 |
| PS | 800 | 1002 | 1089 | 1455 | 1604 | 2857 | 2911 | 3060 | |
| PE | 1075 | 1293 | 1449 | | | 2852 | 2883 | | |
| Teflon | 734 | 1221 | 1302 | 1383 | | | | | |
| PMMA | 813 | 1456 | 1732 | | | 2846 | 2954 | 3009 | |
| NBR | 749 | 954 | 1306 | 1453 | 1530 | 2668 | 2928 | 3055 | |
| TCA | 1001 | 1329 | 1456 | | | | | | |

Tabella 11: Picchi significativi dello spettro Raman di alcuni polimeri di ampio impiego

I risultati della spettroscopia Raman

Sono state selezionate 30 particelle sui vari filtri, sia provenienti dall'analisi dei campioni di sale che dal campionamento dell'aria. Queste particelle sono state analizzate con la spettroscopia Raman e per 17 particelle si è riusciti a identificare il polimero: 7 di polietilene (PE) (grafico 10) (figura 14), 6 di polipropilene (PP) (grafico 11) (figura 15) e 4 particelle di polietilene tereftalato (PET) (grafico 12) (figura 16). Per le altre particelle non è stato possibile ottenere una certa identificazione a causa della degradazione del polimero.

L'analisi è avvenuta solo su una porzione dello spettro Raman per ottenere il risultato più significativo con il minor numero di scansioni ed evitare di rovinare il fragile polimero con la radiazione laser. L'identificazione del polimero è avvenuta per confronto con dei materiali plastici standard; non tutti i picchi dei materiali standard corrispondono con quelli dei campioni, sia per la presenza di coloranti ed interferenti che per la degradazione del polimero. In particolare i risultati della porzione di spettro $2450-3300\text{ cm}^{-1}$ non sono risultati utilizzabili per l'identificazione del polimero.

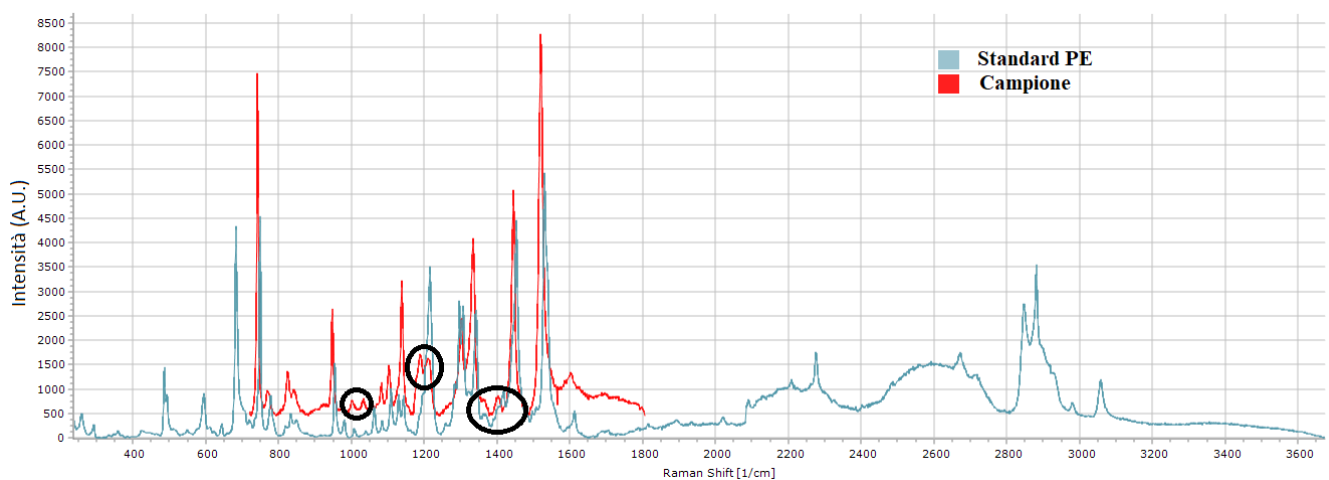


Grafico 10: confronto tra lo spettro Raman dello standard di PE con ftalocianina blu e lo spettro di una particella identificata come PE, evidenziati i picchi del PE

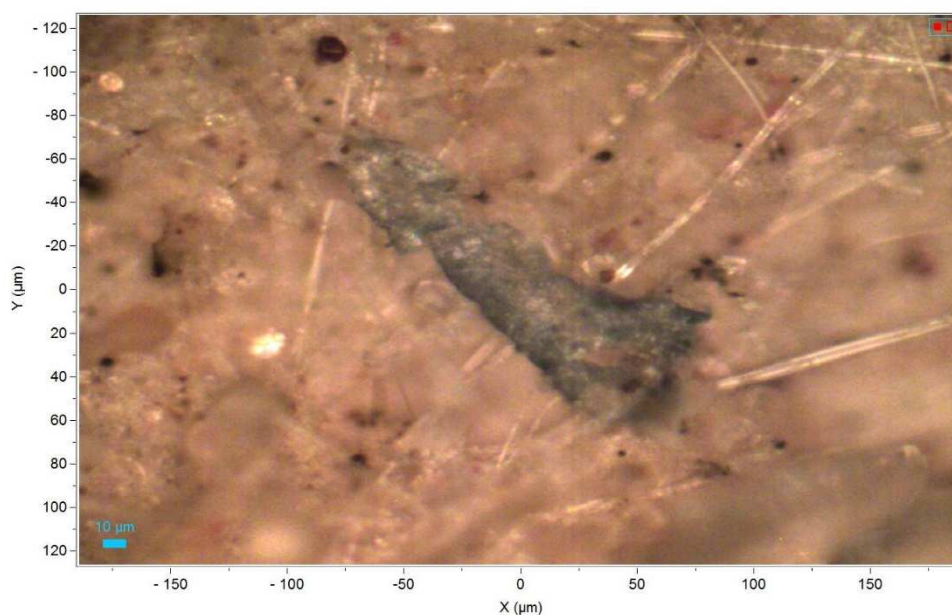


Figura 15: Particella di polietilene analizzata con la spettroscopia Raman

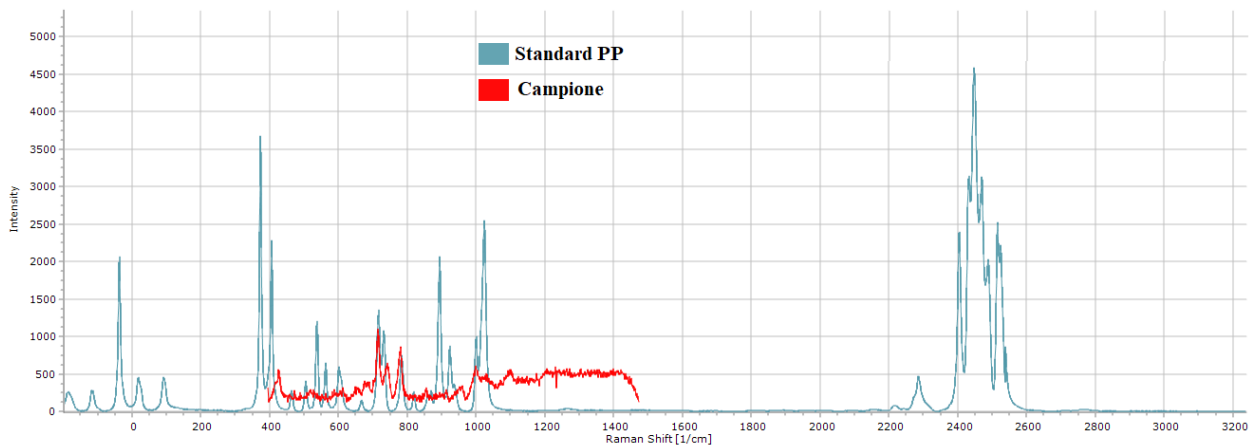


Grafico 11: confronto tra lo spettro Raman dello standard di PP e lo spettro di una particella identificata come PP

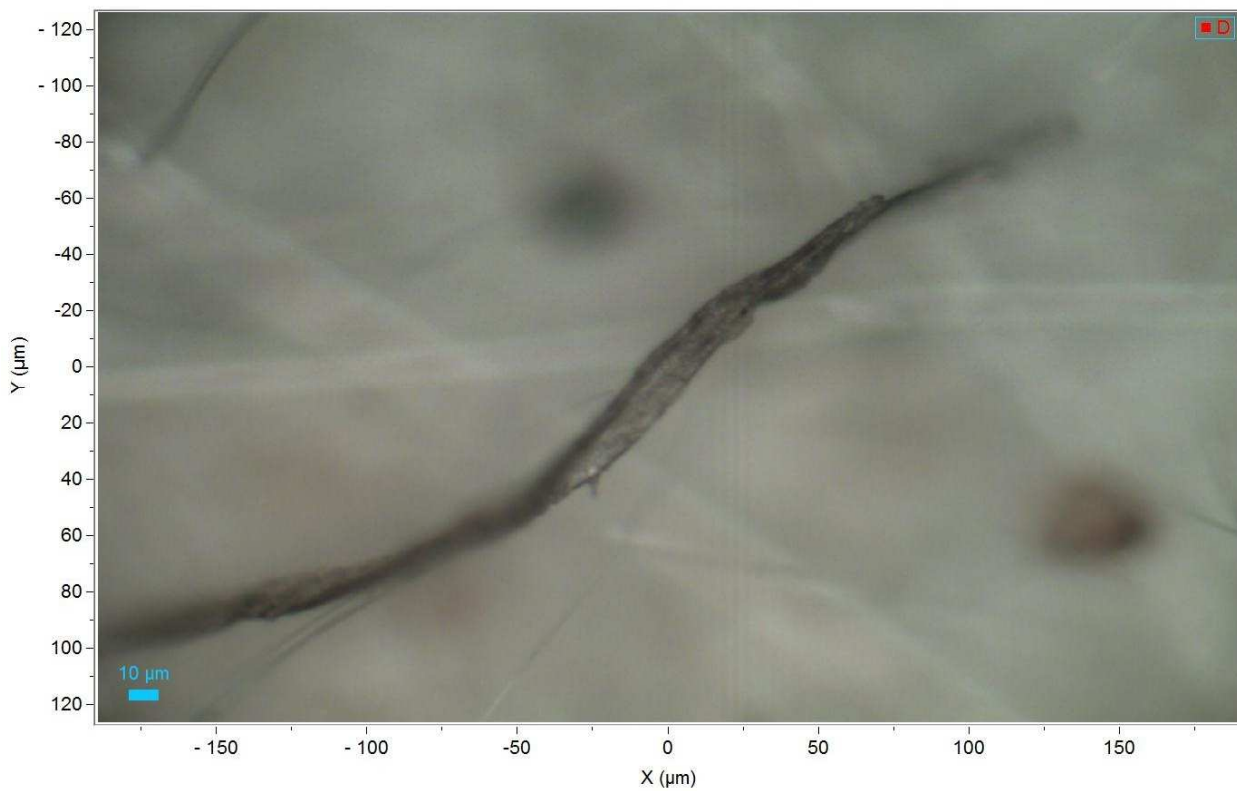


Figura 16: Particella di polipropilene analizzata con la spettroscopia Raman

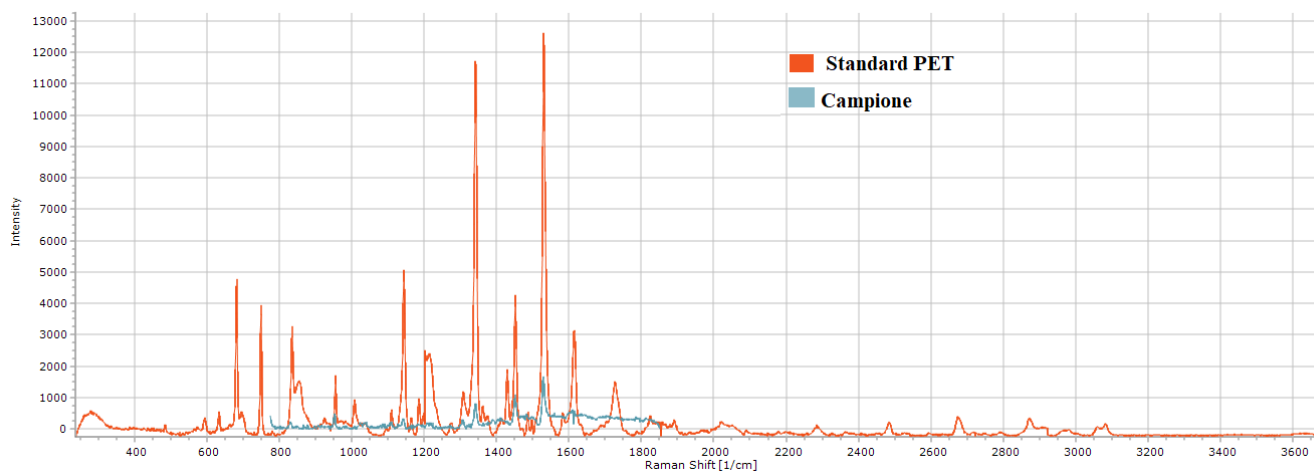


Grafico 11: confronto tra lo spettro Raman dello standard di PET e lo spettro di una particella identificata come PET

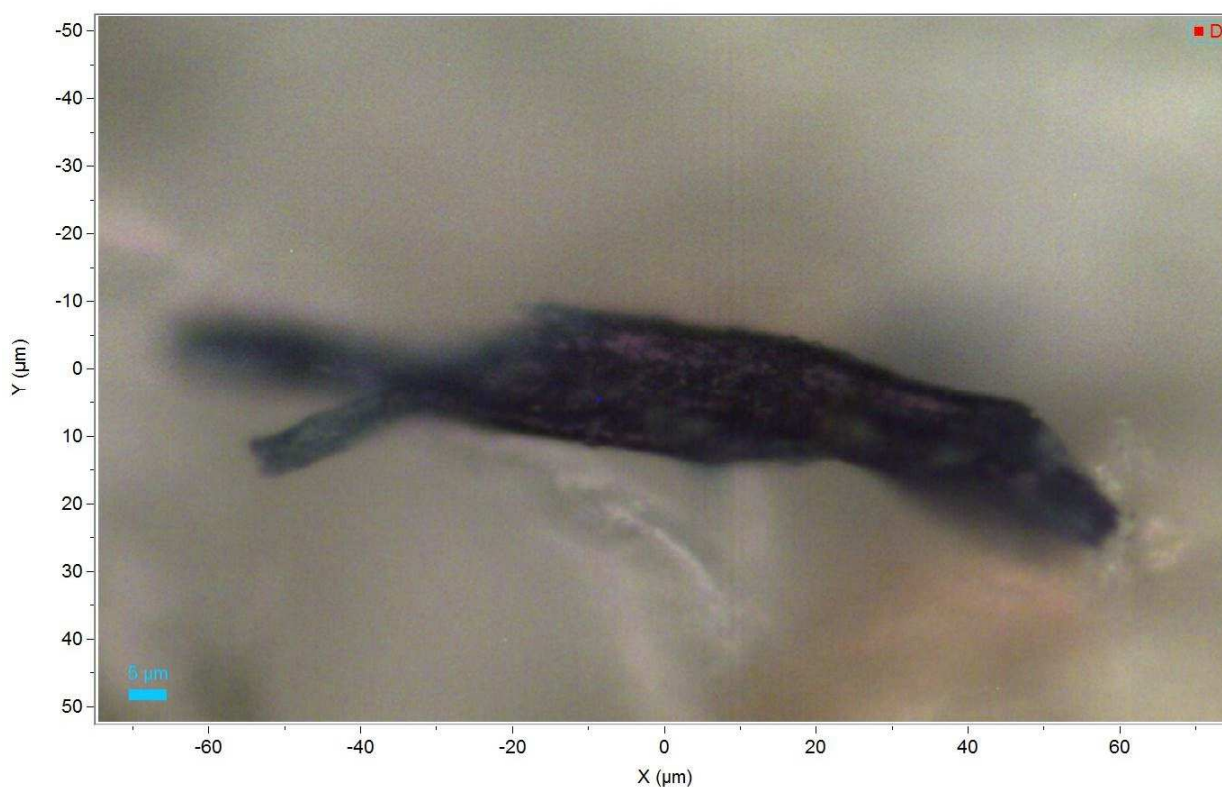


Figura 16: Particella di polietilene tereftalato analizzata con la spettroscopia Raman

Le tecniche di Imaging applicata all'analisi del sale

Il pretrattamento del campione

La collaborazione con il dipartimento di ingegneria dell'università di Aalborg (Danimarca) ha permesso uno studio delle microplastiche nel sale con un approccio basato sull'analisi di tutte le particelle del campione e non solo di alcune, oltre a velocizzare i tempi di analisi; si tratta di un metodo basato sull'imaging sia della spettroscopia Raman che della spettroscopia FTIR, che però richiede un tipo di preparazione del campione molto complesso. Questo metodo è stato sviluppato nel gruppo di ricerca del prof. Vollertsen nell'università di Aalborg ed è stato applicato precedentemente all'analisi delle microplastiche raccolte in mare tramite una rete da traino a manta e tramite un sistema di pompaggio e filtraggio [Rist (2020)]; sono state apportate delle modifiche al metodo per poterlo applicare all'analisi del sale, nello specifico è stata rimossa la parte di digestione enzimatica del campione, inoltre l'analisi con l'imaging Raman non era prevista nel metodo. Il metodo di analisi impiegato prevede un minuzioso protocollo per prevenire la contaminazione del campione. Questo protocollo prevede che tutte le attività siano svolte sotto una cappa a pressione positiva, inoltre la vetreria, le spatole e le pinzette da utilizzare durante le operazioni di analisi vengono pulite, ricoperte di foglio di alluminio e poste in una muffola a 500°C per 5 ore per incenerire le microplastiche presenti. Per evitare contaminazioni, i filtri metallici che vengono utilizzati nelle analisi sono puliti in un bagno ad ultrasuoni e lavati con acqua milliQ filtrata (0,8 µm), tutte le soluzioni sono filtrate (0,8µm) inoltre tutti gli operatori indossano camici e magliette in puro cotone. Il procedimento di analisi del campione inizia con una forte digestione ossidativa del campione: 200 g di sale sono posti in un becher con 100 mL di una soluzione acquosa al 50% di perossido di idrogeno ed un'ancoretta magnetica, quindi la soluzione ed il deposito sono tenuti sotto agitazione (100 giri/min) a 65°C per 24h e 30°C per 48h, infine si aggiungono 800 ml di acqua milliQ filtrata (0,8µm) e si lascia la soluzione sotto agitazione per 24 h. La fase successiva prevede la filtrazione della soluzione tramite un filtro metallico (47 mm di diametro, con diametro dei pori da 1 µm), quindi il filtro è posto in un becher

con 25 ml di una soluzione acquosa di ZnCl_2 con densità $1,8 \text{ g/cm}^3$ ed il becher è posto in un bagno ad ultrasuoni per 15 minuti, in questo modo le particelle sul filtro sono trasferite nella soluzione. In seguito la soluzione di ZnCl_2 viene centrifugata (3000 giri/minuto, 45 minuti) ed il surnatante filtrato su un filtro metallico (47 mm di diametro, con diametro dei pori da $1 \mu\text{m}$), in questo modo si eliminano le particelle di sabbia ed argilla dal campione; in seguito il filtro è posto in un becher con 20 mL di etanolo (99,5%) ed il becher è posto in un bagno ad ultrasuoni per 15 minuti per portare in sospensione le particelle del filtro. La soluzione alcolica è lentamente fatta evaporare in una fiala posta in un bagno termostatico a 50°C con un flusso d'azoto ($1,8 \text{ L/min}$), quindi le particelle sono rimesse in sospensione con 3 mL di etanolo. Questa sospensione di particelle del campione viene impiegata per effettuare le analisi di spettroscopia Raman (figura 17) e di spettroscopia FT-IR (figura 18), dopo che sono state depositate sugli appositi supporti (figura 19).

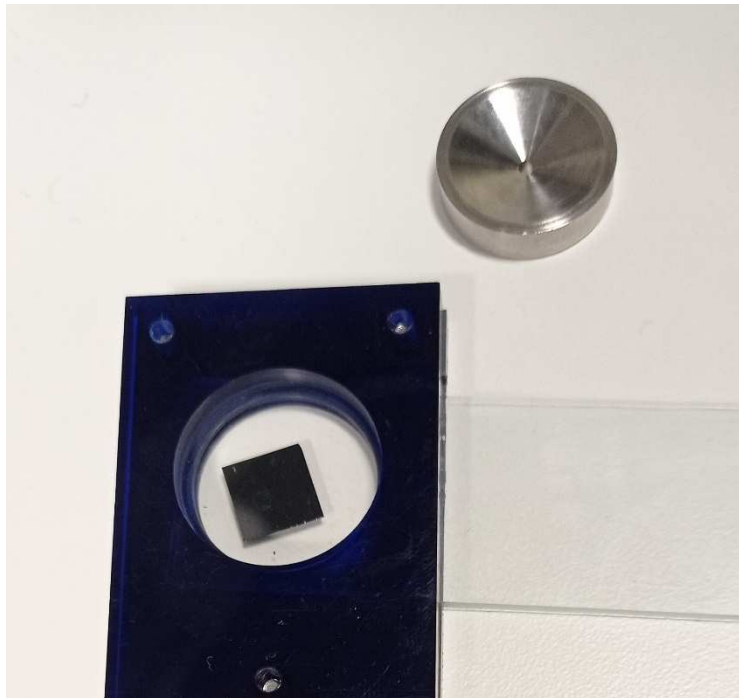


Figura 17: supporto in silicio per l'imaging Raman ed imbuto per la deposizione del campione

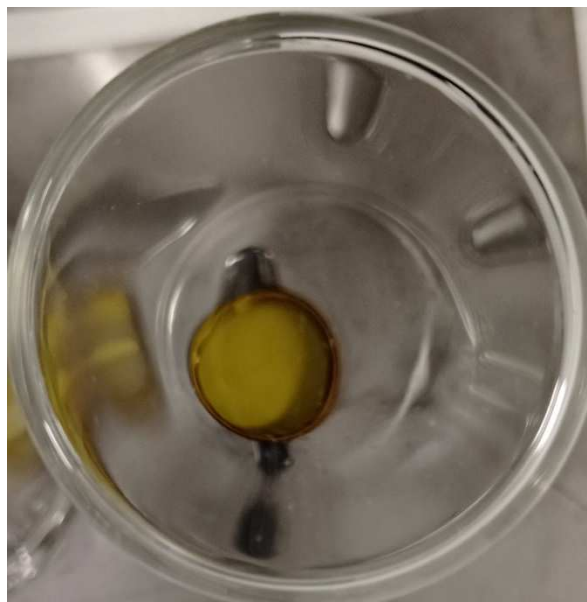


Figura 18: supporto in ZnSe per l'imaging FT-IR

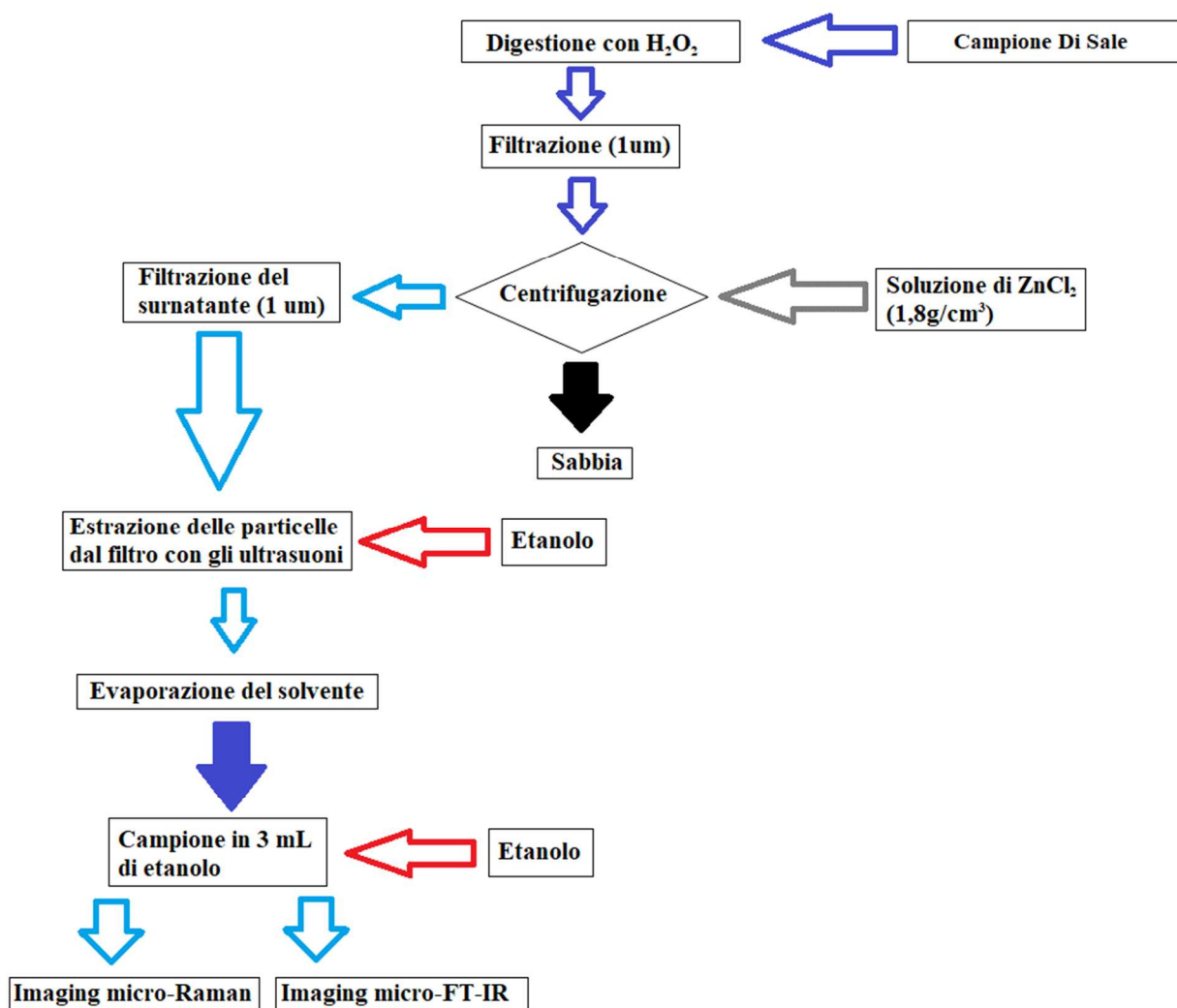


Figura 19: schema di pretrattamento del campione per l'imaging

L'imaging applicato alla spettroscopia Raman

L'imaging micro-Raman ha richiesto una specifica modalità di deposizione del campione: un supporto lucido e quadrato di silice (10 mm di lato, LiftSubstrat) che è stato racchiuso in una specifica custodia composta inferiormente da un vetrino da laboratorio e superiormente da un imbutino metallico che permette la deposizione del campione su un'area circolare di circa 0,5 mm di raggio (figura). Questo supporto è posto sopra una piastra riscaldante a 50°C e coperto da un becher rovesciato per proteggere ulteriormente il campione (l'operazione si svolge sotto una cappa a pressione positiva); 25 µL di sospensione sono depositati sull'imbutino e lasciati asciugare, quindi si prosegue con altre aggiunte fino a depositare 300 µL di sospensione; quando la sospensione è evaporata si estrae il supporto di silicio e lo si analizza con lo spettroscopio Raman Horiba XPloRa Plus tramite il software LabSpec 6. Si tratta di uno strumento che dispone di uno scomparto interno per analizzare il campione senza ulteriori contaminazioni, inoltre la stanza in cui è posto lo strumento è a pressione positiva rispetto all'esterno mediante un sistema di condizionamento e di filtraggio dell'aria. L'analisi con lo spettroscopio Raman è stata effettuata con la modalità imaging: si individua manualmente l'area su cui sono state depositate le particelle del campione, quindi lo strumento cattura una serie di immagini nel visibile fino a coprire l'area selezionata, queste immagini sono catturate con l'ingrandimento 50X e la modalità dark-field per far risaltare le particelle rispetto allo sfondo. L'insieme di queste immagini forma un mosaico che copre l'area selezionata (figura 20), questo mosaico è analizzato da una funzione avanzata del software LabSpec 6 che tramite uno script, sviluppato dal gruppo di ricerca, permette di distinguere le singole particelle dallo sfondo in funzione di una serie di proprietà: posizione, area, perimetro, circolarità e luminosità rispetto allo sfondo. Selezionando degli intervalli di valori per una o più di queste proprietà, il software selezionerà le particelle corrispondenti e le analizzerà. L'analisi delle particelle è effettuata per tutte le particelle di dimensioni superiori a 20 µm, utilizzando il laser 532 nm per 5 secondi ad analisi e rilevando lo spettro di emissione (Stokes shift) da 50 a 4000 cm⁻¹, l'analisi è stata ripetuta 10 volte per ogni particella.

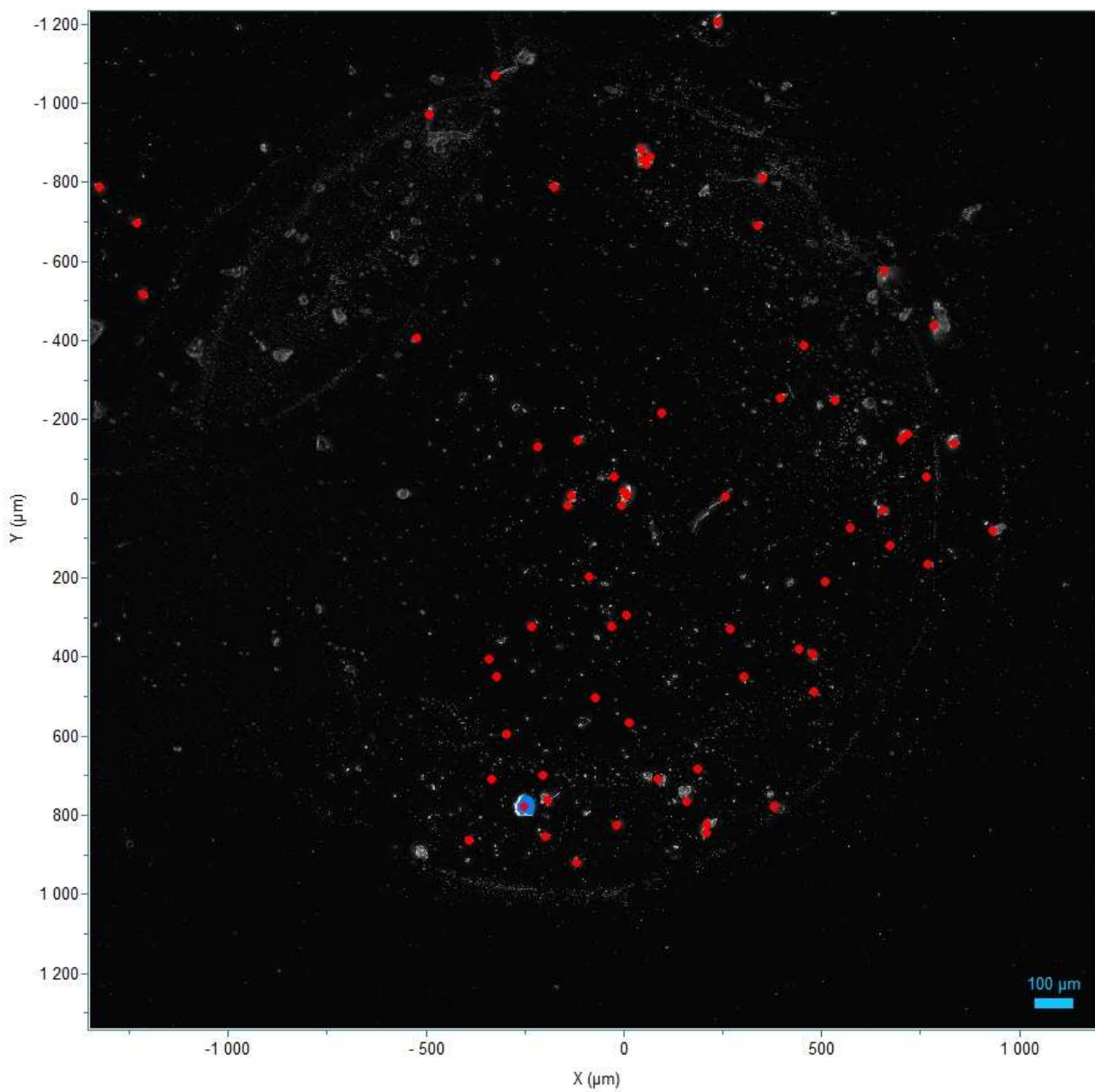


Figura 20: esempio di mosaico di immagini in modalità dark-field, i punti rossi indicano le particelle selezionate, il campione è il sale S1

I risultati dell'analisi di imaging Raman

La metodica di analisi del sale che impiega l'imaging per la spettroscopia micro-Raman ha permesso di analizzare le particelle di dimensioni inferiori rispetto alla classica microscopia Raman, arrivando fino a $25 \mu\text{m}^2$, inoltre permette di individuare un numero di particelle molto superiore rispetto all'osservazione manuale con un microscopio (grafico 12).

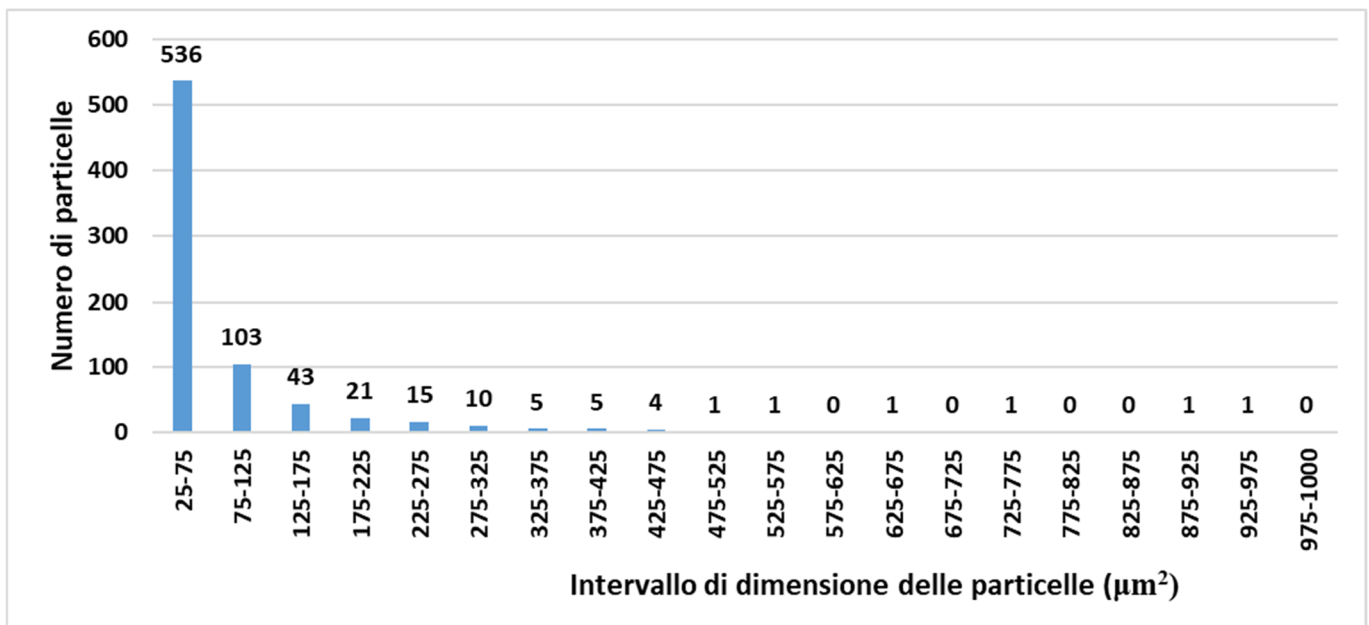


Grafico 12: distribuzione delle particelle del campione S1 tra 25 e $1000 \mu\text{m}^2$

Nonostante il complesso pretrattamento del campione, una larga parte delle particelle analizzate è risultata essere composta da silicati e solo per un piccolo numero di particelle è stato possibile determinare con certezza il tipo di polimero, in quanto il loro indice di accordo rispetto allo spettro di riferimento è risultato pari o superiore al 85%. Per un discreto numero di particelle l'analisi dello spettro Raman ha mostrato una probabile natura polimerica, ma le analisi successive non sono riuscite a determinare con esattezza il tipo di polimero ed in una serie di casi hanno portato alla degradazione della particella a causa della radiazione laser. Le piccole dimensioni, la degradazione e l'aggressivo pretrattamento del campione potrebbero essere la causa di questo risultato. Sono stati sottoposti ad imaging

Raman 6 campioni di sale (S1, S2, S3, S4, S5, S6), ma l'analisi del campione S3 non ha mostrato la presenza di polimeri identificabili con certezza. Negli altri campioni sono state osservate in totale diverse particelle di PVC (figura 23), polistirene (figura 21), PET (figura 24), politetrafluoroetilene (figura 21) e solo due particelle di polietilene (grafico 13) (grafico 14). Questo risultato potrebbe essere dovuto alla maggior resistenza alla degradazione del PVC rispetto al polietilene ed al polipropilene, ciò non esclude una presenza significativa di polietilene e polipropilene nei campioni in quanto le particelle di PE e PP potrebbero solo essere troppo degradate per l'analisi con la spettroscopia Raman

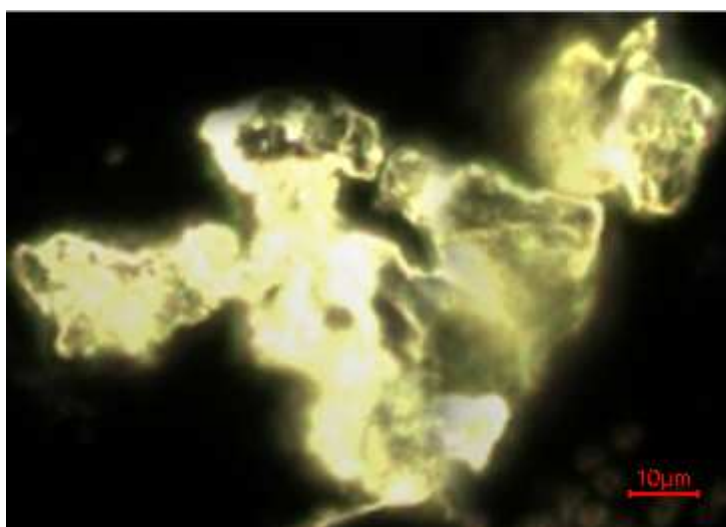


Figura 21: particella di PFE

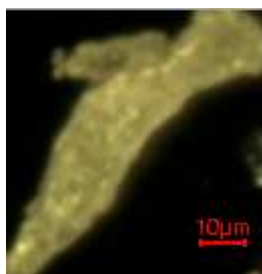


Figura 22: particella di PS

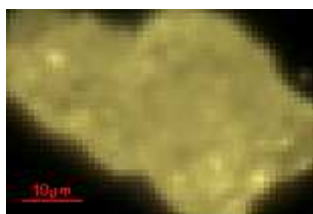


Figura 23: particella di PVC

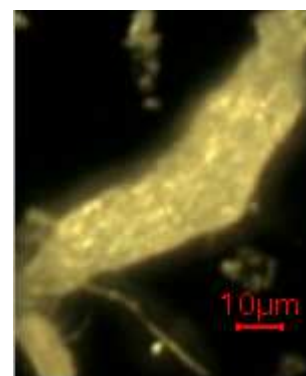


Figura 24: particella di PET

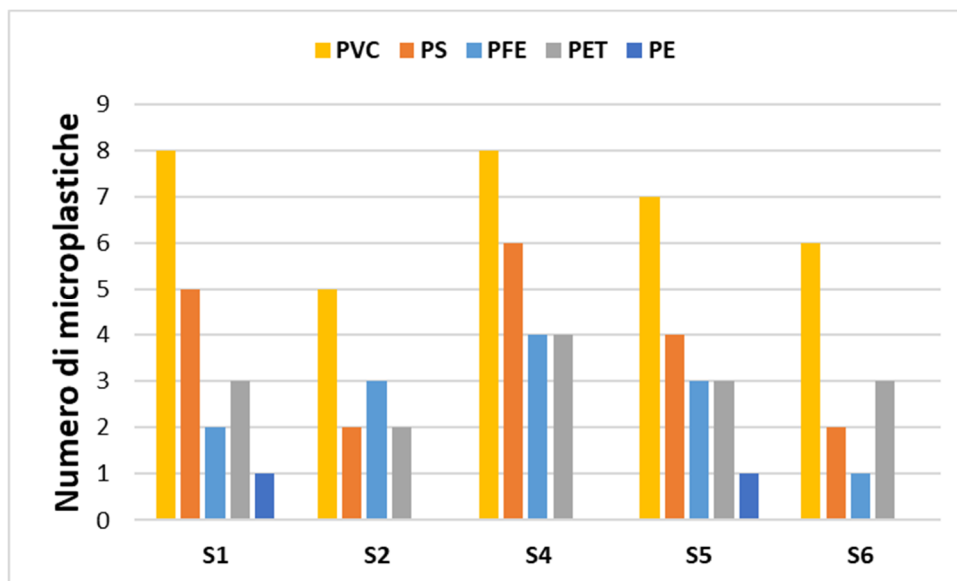


Grafico 13: numero di microplastiche identificate con l’imaging Raman

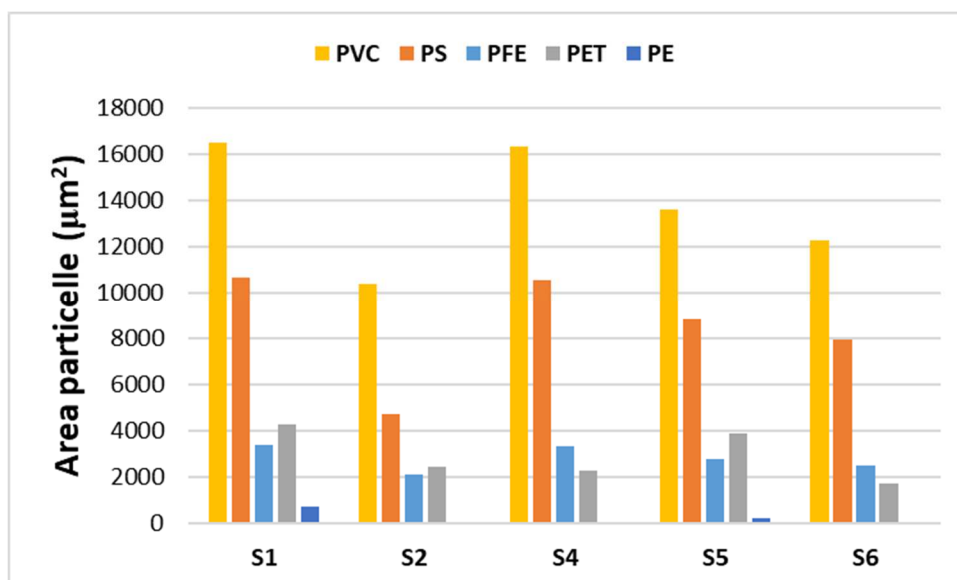


Grafico 14: area totale delle microplastiche identificate con l’imaging Raman

In tutti i campioni di sale analizzato la maggior quantità di particelle trovate, sia per numero che per area è di PVC, mentre il secondo polimero per quantità è il polistirene, è stato trovato un frammento di polietilene sia nel campione S1 che nel campione S5. Sono presenti poche particelle di polietilene tereftalato (PET) ed il politetrafluoroetilene (PFE) La mancata rilevazione di particelle polimeriche nel campione S3 è probabilmente dovuta all’alta purezza del campione (cloruro di sodio di qualità analitica).

L'imaging applicato alla spettroscopia FT-IR

La spettroscopia micro-FT-IR richiede un particolare metodo di deposizione del campione su uno specifico supporto, una finestra trasparente alla radiazione infrarossa di ZnSe (13 mm diametro, 2 di spessore) che è posta in un'apposita cella metallica (PIKE Technologies, Fitchburg, WI, USA) con un'apertura inferiore posta su una piastra riscaldante a 50°C ed un'apertura superiore appoggiata ad imbuto metallico. La sospensione con le particelle del campione è versata gradualmente (100 μL alla volta) tramite una pipetta in vetro sopra l'imbuto metallico che fa depositare le particelle in un'area circolare di 10 mm di diametro, quindi il supporto è coperto con un becher rovesciato per evitare contaminazioni e lasciata ad asciugare per 48 ore (figura 25). In seguito il supporto di ZnSe è posto nel micro-FT-IR (Argilent Cary 620/670), il sistema dispone di uno scomparto dove il campione può essere analizzato senza ulteriori contaminazioni ed in un'atmosfera di azoto puro per evitare le interferenze dell'anidride carbonica e del vapore acqueo, si tratta di uno strumento a detector FPA (focal plane array) 128x128 pixel ed a sensori raffreddati ad azoto liquido. Queste caratteristiche permettono una scansione in trasmissione dell'intera superficie in circa 4 ore, con una risoluzione spaziale di 5,5 μm tra punto e punto, un intervallo spettrale di analisi 3750-850 cm^{-1} ed una risoluzione spettrale di 8 cm^{-1} . L'analisi del campione è in gran parte automatizzata, il suo risultato è un mosaico di immagini nel visibile (figura 26) ed un file di circa 20 Gb con tutte le scansioni effettuate; il file viene analizzato da un software sviluppato dal gruppo di ricerca, siMPle, [Primpke (2020)], che consente l'analisi automatizzata di grandi set di dati di imaging μ -FT-IR. Il software siMPle esegue una correlazione di Pearson tra ogni spettro campione e il database degli spettri dei polimeri utilizzando lo spettro grezzo, la sua prima e la sua seconda derivata, ricostruendo ciascuna particella dagli spettri FTIR dei pixel che copre e quindi fornendo una mappa in falsi colori dei materiali identificati nel campione. Il software fornisce anche misurazioni morfologiche e dimensionali delle correlazioni trovate, ma richiede una notevole capacità di calcolo per eseguire l'analisi in tempi ragionevoli.



Figura 25: sistema di deposizione per l'imaging FT-IR

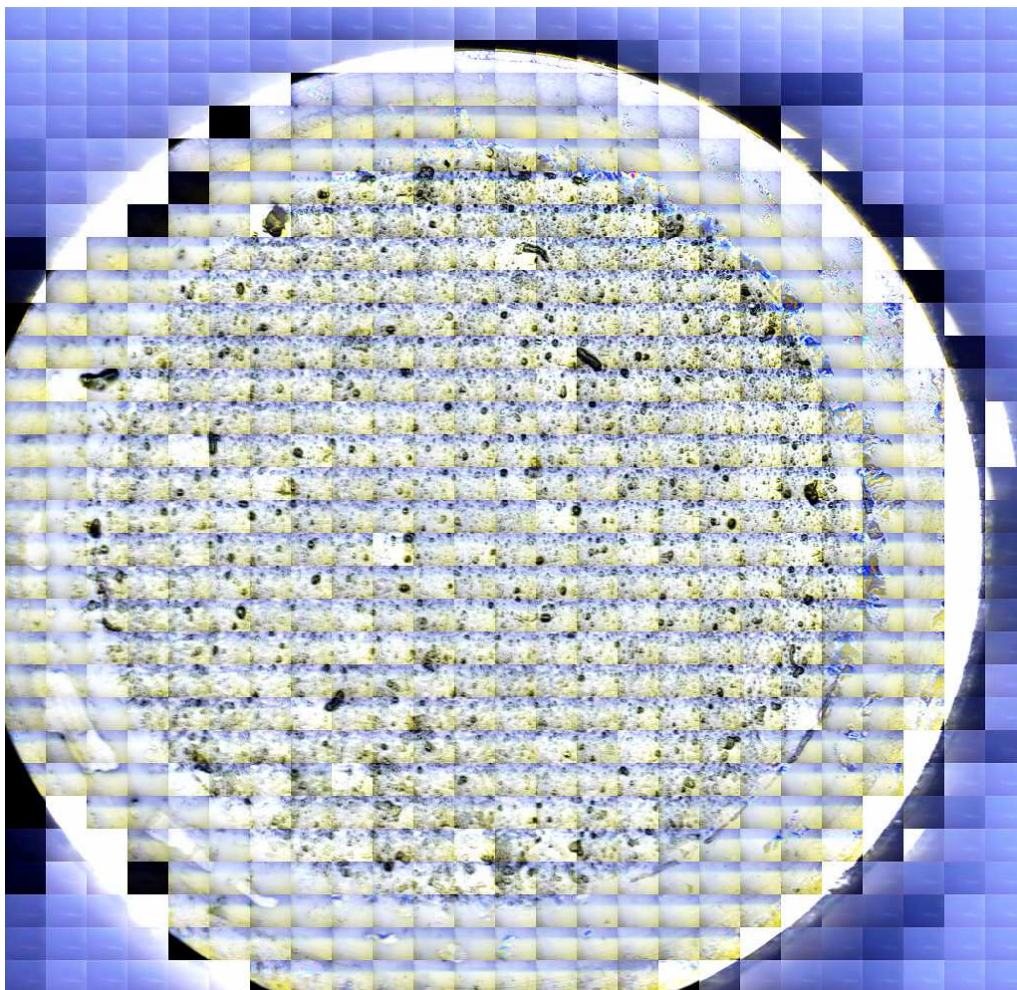


Figura 26: mosaico campione FT-IR

I risultati dell'analisi di imaging FT-IR

L'analisi dei campioni con l'imaging micro-FT-IR è avvenuta in maniera automatizzata per confronto con un database di riferimento (figura 27) ed ha rilevato in tutti i campioni delle microparticelle di cellulosa, mentre la presenza delle microplastiche è risultata molto variabile e nel campione S3 non sono state rilevate particelle plastiche. Nei campioni di sale sono stati rilevati solo quattro polimeri: PE, PVC, PP e poliammidi (PA) (grafico 15).

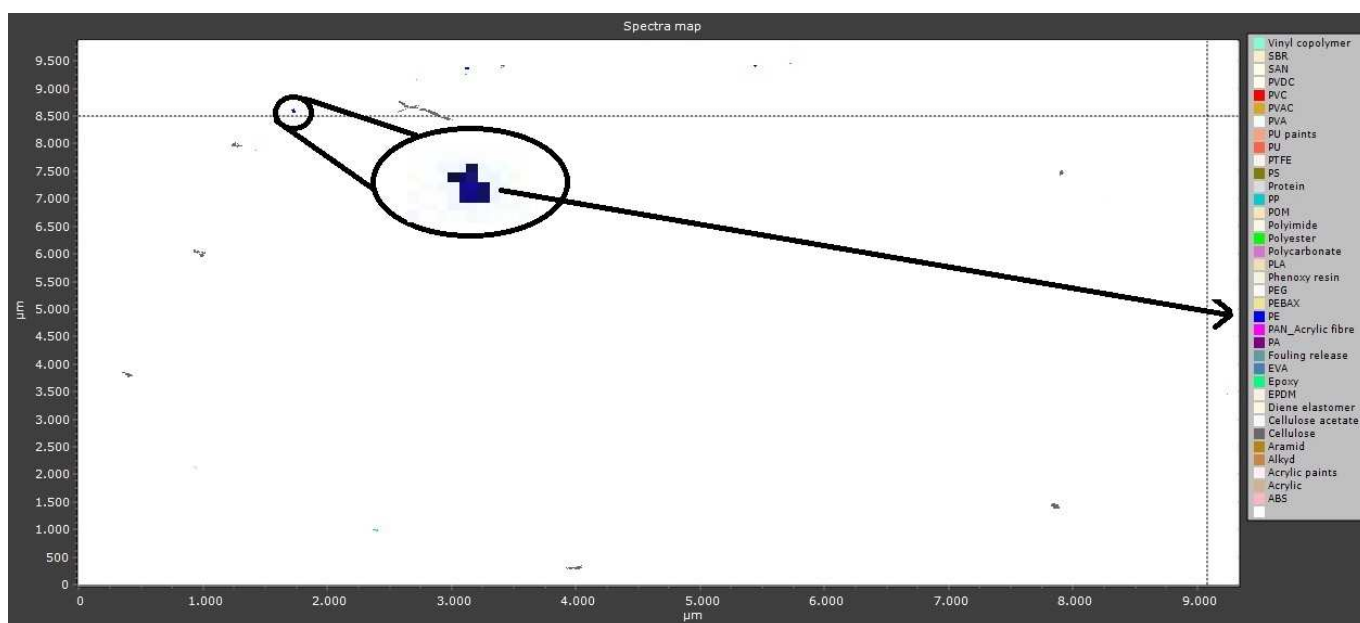


Figura 27: software per l'analisi dell'imaging micro-FT-IR, è riportato l'ingrandimento di una particella identificata come PE proveniente dal campione S1

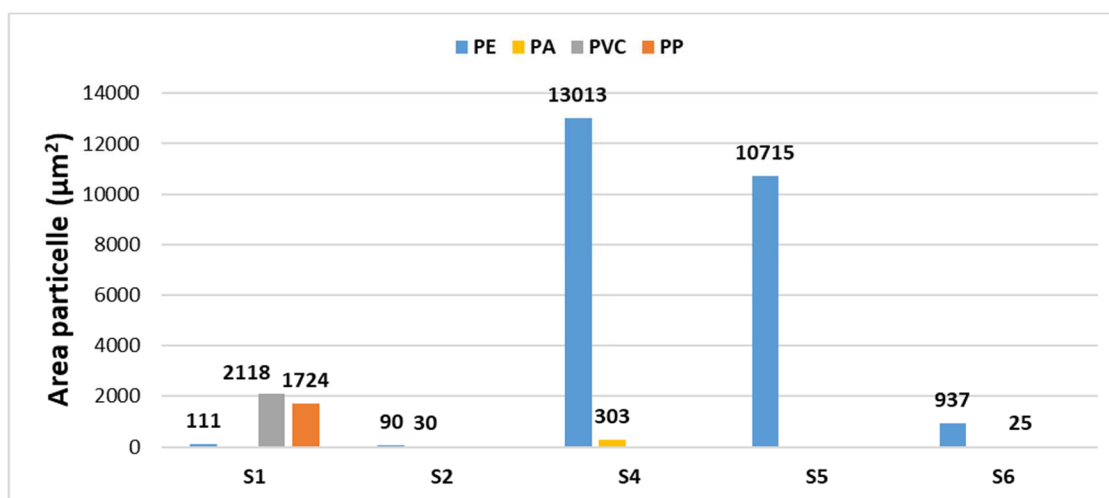


Grafico 15: Area totale delle microplastiche trovate in 0,5 mL (su 3 mL) di soluzione depositata per l'imaging Raman

Nei campioni di sale S1, S2, S4, S5 ed S6 sono state rilevate delle particelle di PE, in quantità variabili, il PP è stato rilevato solo nel campione S1, il PVC solo nei campioni S1 ed S6 e le poliammidi solo nei campioni S2 ed S3 (grafico 16). I risultati dell'imaging micro-FT-IR mostrano una presenza molto variabile delle microplastiche nei campioni di sale.

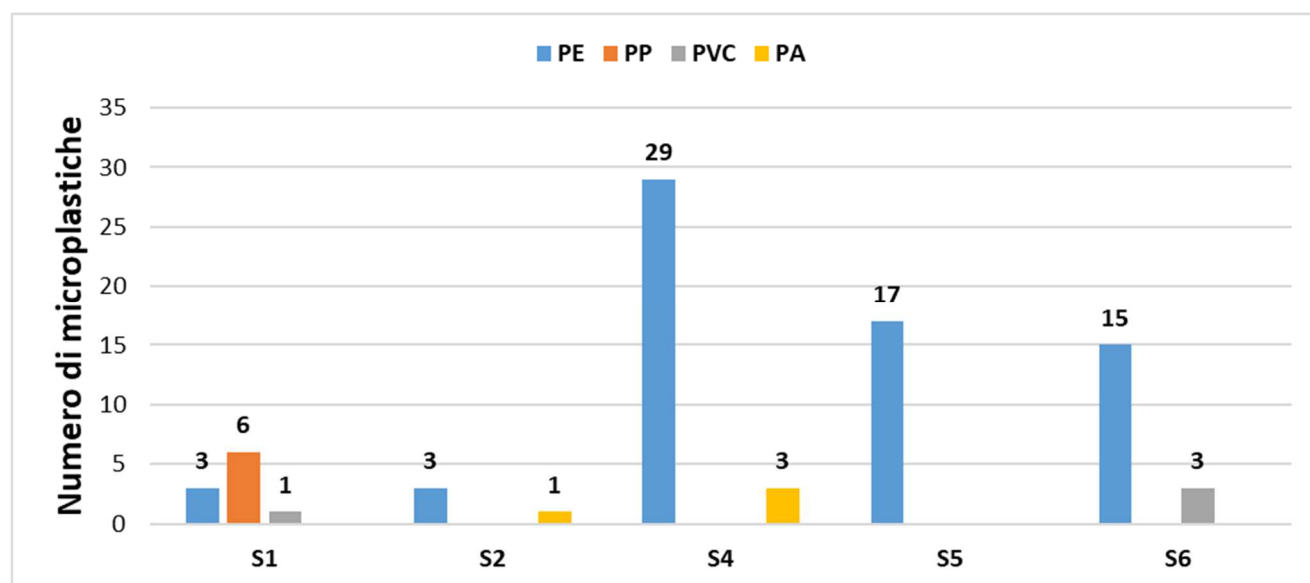


Grafico 16: Numero di microplastiche trovate in 0,5 mL (su 3 mL) di soluzione depositata per l'imaging Raman

I risultati dell'imaging Raman e dell'imaging micro-FT-IR sono profondamente diversi per i tipi e le quantità di microplastiche che rilevano, ma ciò è dovuto principalmente alla differente natura delle tecniche di analisi. La spettroscopia Raman opera in riflessione sul campione e necessita di particelle dotate di una grandezza minima, ma soprattutto di uno spessore minimo per evitare che la radiazione luminosa sia riflessa dal supporto sottostante; se non vi sono queste condizioni in quanto la particella di microplastica si è deformata "squagliandosi" in una particella di area superiore ma minore spessore, lo spettro Raman si può deformare al punto da rendere impossibile il riconoscimento del tipo di polimero. L'imaging FT-IR opera in trasmissione e dà i migliori risultati analizzando le sottili pellicole di polimero, mentre le particelle troppo spesse non riescono ad essere analizzate in quanto

la radiazione non riesce ad attraversarle. Infine bisogna sottolineare che le microplastiche presenti nei campioni di sale sono parzialmente degradate e che il campione è stato sottoposto ad un pesante pretrattamento che ha comportato un forte attacco ossidativo con il perossido di idrogeno, l'esposizione ad un reattivo corrosivo ($ZnCl_2$) ed un solvente (etanolo puro), mentre la deposizione del campione sul supporto è avvenuta a caldo ($55^\circ C$). Le conseguenze di tutti questi fattori potrebbero aver causato un maggior rammollimento di un polimero più debole come il polietilene, e di ottenere una particella molto più sottile, facilmente analizzabile dalla spettroscopia FT-IR ma non dalla spettroscopia Raman. Al contrario le particelle di polimeri più inerti e resistenti come il PVC ed il politetrafluoroetilene sono rimaste maggiormente integre nel loro spessore e sono state facilmente analizzate con la spettroscopia Raman, ma non dalla spettroscopia FT-IR. In conclusione i risultati delle tecniche di imaging andrebbero intesi, almeno parzialmente, come complementari.

Analisi del pulviscolo atmosferico

L'analisi delle microplastiche nel pulviscolo atmosferico è stata effettuata tramite un campionatore artigianale formato da una pompa ad aria calibrata collegata ad un crogiolo filtrante di gooch (figura 28) con un filtro in fibra di vetro non legato (Millipore, 47 mm Ø, con pori da 2,5 µm). Il sistema è calibrato per aspirare 2,1 L/min di aria. Terminato il periodo di campionamento il gooch è ricoperto con un foglio di alluminio fino a quando il filtro non è prelevato per l'analisi. Il primo campionamento è stato effettuato sotto una cappa chimica Köttermann, che ha un volume interno di circa 1,5 m³, pulita e non in funzione, per ottenere i valori di un'ambiente "pulito"; successivamente sono stati eseguiti dei campionamenti in un laboratorio chimico con un'area di circa 70 m² ed il soffitto a circa 4 m di altezza; si tratta di un ambiente dove non avvengono attività di lavorazione della plastica o manipolazione di micro e nanomateriali, inoltre non vi è alcun dispositivo di pulizia dell'aria. I campionamenti nel laboratorio chimico sono stati svolti in giorni di normale attività del laboratorio, con le finestre parzialmente aperte e con il personale di laboratorio normalmente presente; è stato effettuato il campionamento dell'aria anche durante i periodi in cui il laboratorio era chiuso. Un altro ambiente che è stato analizzato è un laboratorio dove avviene la lavorazione di materiale plastico, grazie alla collaborazione del dottor Scoppettuolo del dipartimento di ingegneria chimica, materiali ed ambiente (Università La Sapienza); si tratta di un ambiente di circa 15 m² con un soffitto a 3 m di altezza. La lavorazione di materiali plastici che avviene nel laboratorio campionato consiste principalmente nel taglio di una serie di fili di vari tipi di plastica con una troncatrice; i campionamenti sono stati effettuati per 24 h dalle 10 di mattina (orario di inizio delle lavorazioni) in una giornata durante la quale vi è stata la lavorazione della plastica ed un'altra giornata in cui non è stata utilizzata la troncatrice, ma il laboratorio era aperto. Dopo questi campionamenti sono state analizzate le microplastiche nel pulviscolo atmosferico di un importante ambiente di lavoro: un impianto di trattamento dei rifiuti di apparecchiature elettriche ed elettroniche (RAEE), grazie alla disponibilità della Vallone S.r.l. e della dott.ssa Pomata dell'INAIL (istituto nazionale per l'assicurazione contro gli infortuni sul

lavoro). L'impianto di trattamento dei rifiuti è composto da due capannoni industriali entrambi di circa 1000 m² e con un soffitto a circa 4 metri di altezza; un capannone (Z1) è dedicato allo smaltimento di computers e schermi TV, mentre l'altro (Z2) è utilizzato per smaltire i piccoli elettrodomestici; in entrambe le zone i rifiuti sono parzialmente smontati per rimuoverne le parti plastiche, che sono successivamente macinate e compresse nello stesso ambiente di lavoro. L'analisi delle microplastiche nel pulviscolo atmosferico è stata effettuata in due occasioni in entrambi gli ambienti di lavoro durante l'orario di attività, dalle 12 alle 16.



Figura 28: sistema di campionamento del pulviscolo atmosferico

I risultati dell'analisi del pulviscolo atmosferico

L'analisi dei filtri utilizzati per la raccolta del pulviscolo atmosferico è avvenuta con il microscopio Motic BA200 equipaggiato con la fotocamera OMAX A3530U (3.2 Megapixel) ed ogni particella che per forma o colore sembrasse una microplastica è stata fotografata e l'immagine elaborata con i software Toupview ed ImageJ per determinare le dimensioni delle particelle. L'analisi dei filtri in fibra di vetro utilizzati per misurare la contaminazione dell'aria nella cappa sotto cui si sono svolte le analisi non ha rilevato alcuna particella che potesse sembrare una microplastica. L'analisi dei filtri utilizzati per le analisi del particolato atmosferico (grafico 17) mostra l'aumento di dieci volte del contenuto di microplastiche tra un campionamento di 24 h ed uno di 96 nel laboratorio (Lab). Nel laboratorio in cui avviene la lavorazione della plastica è stata rilevata una concentrazione di microplastiche nel pulviscolo atmosferico quasi doppia rispetto a quella di un generico laboratorio ed il campionamento è stato fatto durante un periodo in cui il laboratorio non era in attività (Ing N A). L'analisi effettuata nel laboratorio per la lavorazione delle plastiche in attività (Ing A) ha rivelato una concentrazione di microplastiche nel particolato atmosferico quasi cinque volte superiore a quando non era in attività. La presenza delle microplastiche nel particolato dell'impianto di trattamento dei rifiuti (RAE) è diminuita di molto tra il primo ed il secondo campionamento, ma in entrambi i campionamenti nella zona 2 sono state rilevate più microplastiche nell'aria rispetto alla zona 1.

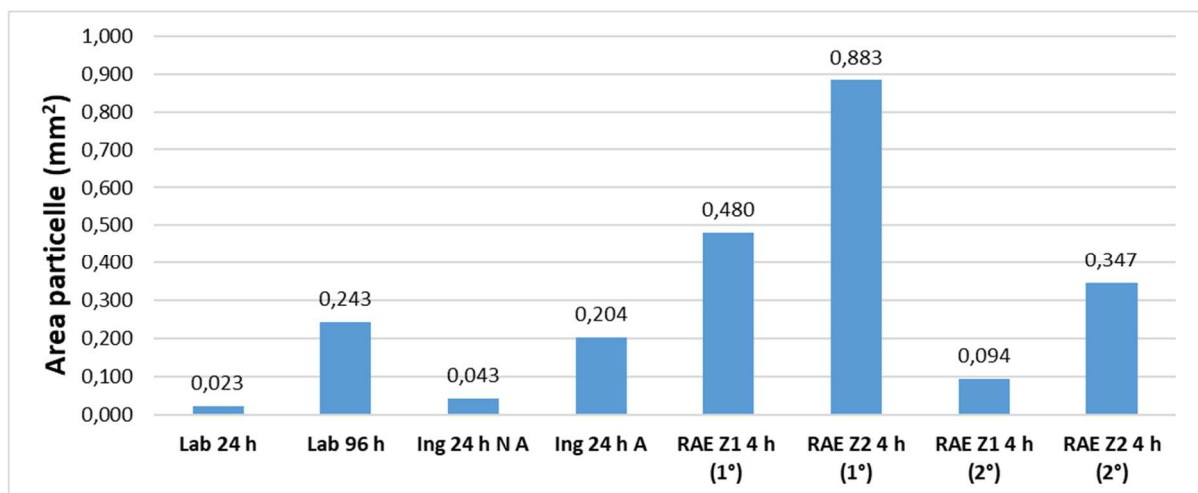


Grafico 17: area totale delle probabili microplastiche sui filtri

Il numero di microplastiche trovate sui filtri è correlato all'area totale delle microplastiche trovate sui filtri (grafico 1), ma nel caso del secondo campionamento nell'impianto di trattamento dei rifiuti (RAE) è stato contato un numero simile di particelle nelle due zone, mentre l'area complessiva delle microplastiche trovate nella zona 2 è quasi il quadruplo di quelle trovate nella zona 1. Ciò è dovuto alla diversa dimensione delle particelle (grafico 19): nel secondo campionamento della zona 1 non sono state trovate particelle di area superiore a 10000 μm^2 , mentre nella zona 2 il maggior numero di particelle è di dimensioni comprese tra 10000 μm^2 e 20000 μm^2 .

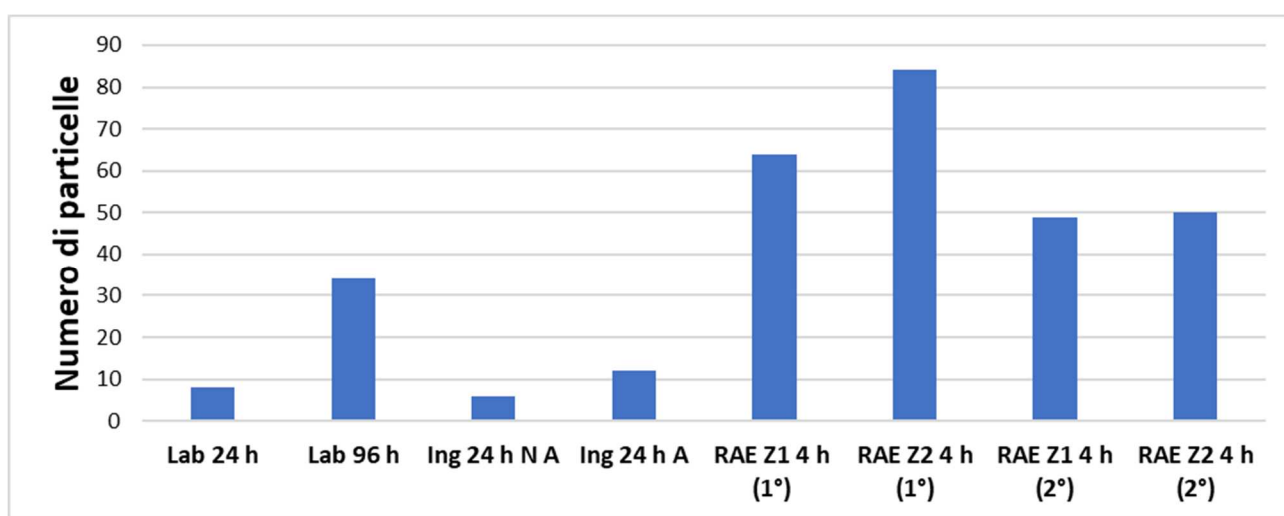


Grafico 18: numero di particelle trovate sul filtro

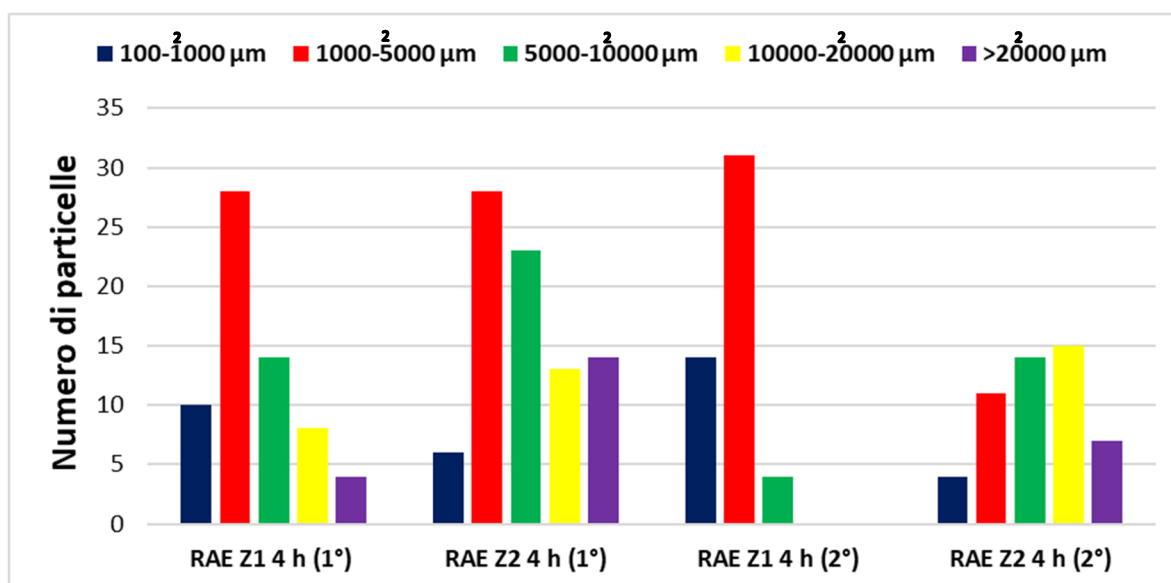


Grafico 19: numero di particelle sul filtro divise per dimensione

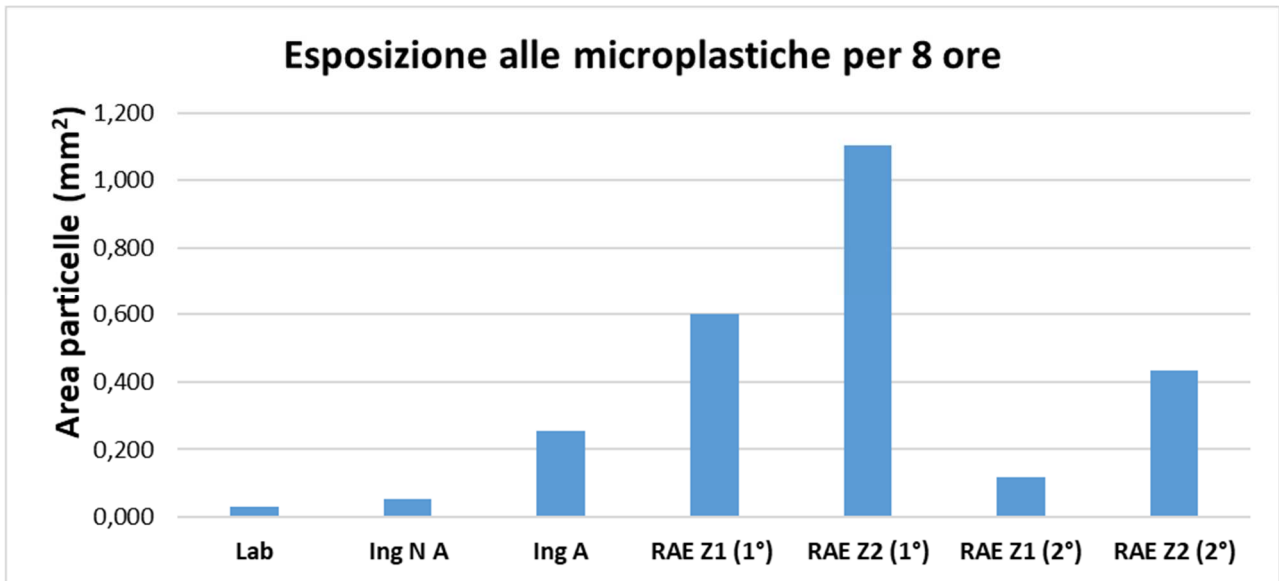


Grafico 20: esposizione alle microplastiche nell'ambiente per otto ore

Il sistema di campionamento del pulviscolo atmosferico è stato calibrato per aspirare l'aria a 2,1 litri al minuto, considerando che una persona inspira a riposo mediamente 6 litri d'aria al minuto [Pleil (2021)] è stata calcolata la quantità di microplastiche ispirate in 8 ore di permanenza nell'ambiente (grafico 20). Quasi tutte le particelle che sono state campionate erano di colore rosso, blu o nero (grafico 21).

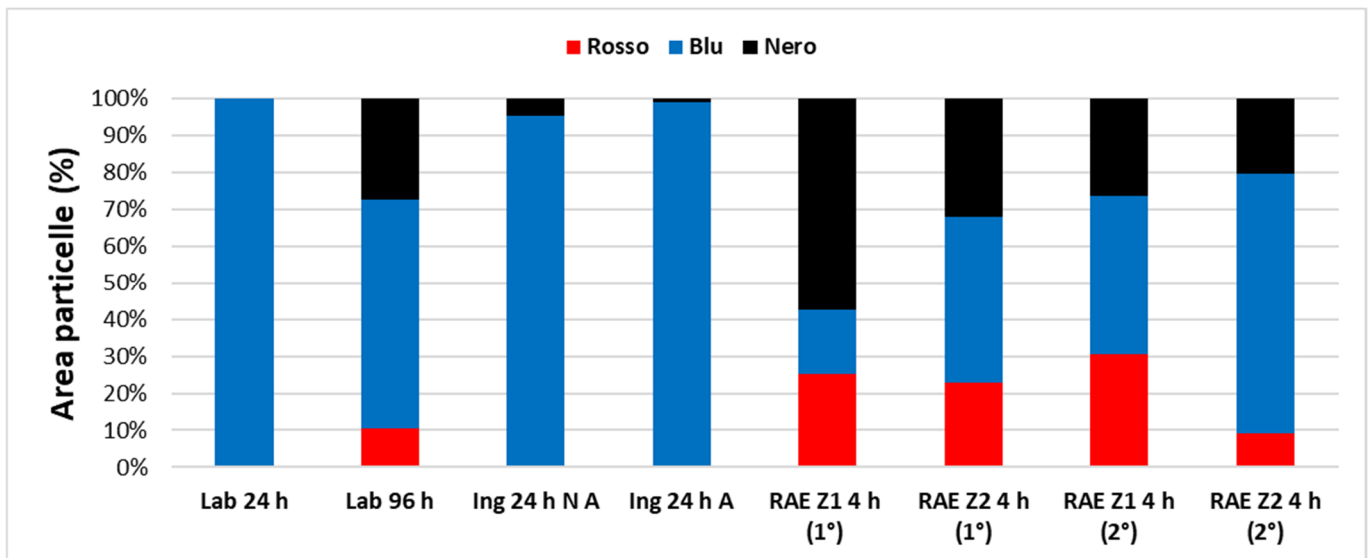


Grafico 21: area totale delle microplastiche su un filtro divise per colore

Analisi degli indicatori dell'esposizione alle microplastiche: ftalati

Come indicatori dell'esposizione umana alle microplastiche sono stati scelti sette esteri dell'acido ftalico, ampiamente utilizzati come plastificanti. L'analisi di queste molecole è avvenuta con la collaborazione del prof. Avino e del dott. Notardonato presso il dipartimento di agricoltura, ambiente ed alimenti, Università degli Studi del Molise. L'attività di ricerca si è concentrata nell'ottimizzare un metodo per l'analisi di queste molecole nelle urine, utilizzando una soluzione che simuli l'urina umana; l'analisi degli ftalati è avvenuta con un'estrazione in fase solida (SPE) e l'impiego di un gascromatografo con rilevatore a ionizzazione di fiamma (FID).

Sviluppo del metodo di analisi degli esteri dell'acido ftalico

Gli esteri dell'acido ftalico che sono stati scelti per essere analizzati sono: il dimetilftalato (DMP), il dietilftalato (DEP), il dibutilftalato (DBP), il dipentilftalato (DPP), il di(2-etil esil)ftalato (DEHP), dioctilftalato (DOP) e didecilftalato (DDP). L'analisi di queste molecole nell'urina è stata simulata con una soluzione che acquosa chimicamente simile all'urina per poter avere una matrice più simile all'originale dell'acqua distillata; si tratta di una soluzione acquosa contenente 20 g/L di urea (Sigma-Aldrich, grado tecnico), 10 g/L di cloruro di sodio (Sigma-Aldrich, grado tecnico), 1,5 g/L di creatinina (Sigma-Aldrich, grado tecnico), 0,1 g/L di glucosio (Sigma-Aldrich, grado tecnico) e di pH 6,5 stabilizzato per aggiunta di un tampone fosfato (Roche) [Chutipongtanate (2010)]. Il primo passaggio dell'analisi questa soluzione, a cui sono stati aggiunti gli ftalati (Supelco, Certified reference material) prevede l'estrazione in fase solida degli analiti dalla soluzione: la soluzione è stata posta in un imbuto separatore collegato ad una cartuccia per l'SPE artigianale. La cartuccia era stata precedentemente pulita con il passaggio di una serie di reagenti a polarità decrescente: 5 mL di acetone, 5 mL di metanolo e 5 mL di eptano; in seguito la cartuccia è stata attivata con il passaggio di 5 mL di metanolo e 5 mL di eptano. Dopo l'attivazione della cartuccia è stato fatto passare attraverso la cartuccia un determinato volume della soluzione che simula l'urina contenente gli analiti con una velocità di flusso di circa 1

mL/min. L'estrazione degli analiti dalla cartuccia è stata eseguita con 5 ml di solvente, che è stato raccolto in una fiala; la soluzione è stata lasciata evaporare a temperatura ambiente con un leggero flusso d'aria, quindi gli analiti sono stati ridisciolti in 0,5 mL di eptano ed è stato aggiunto lo standard interno, 5 µL di fenantrene (100 ppm in eptano, Supelco, qualità analitica). Il volume di 1 µL di soluzione è stato iniettato nel GC-FID (Dany 8610 HT), che impiega una colonna capillare (30 m, 5% fenile, 95% dimetilsilossano, Teknokroma) e come fase mobile l'idrogeno (1 mL/min); la colonna è riscaldata durante l'analisi da 50°C a 280 °C a 10°C/minuto. Il metodo è stato studiato per un contenuto di ftalati nelle urine da 250 µg/L ad 1 mg/L ed impiega reagenti di qualità analitica ($\geq 99\%$, Supelco), inoltre tutti i solventi impiegati sono ad alta purezza (HPLC grade, $\geq 99,8\%$, Sigma-Aldrich); è stata impiegata solo acqua milliQ per le soluzioni che simulano l'urina, inoltre tutta la vetreria utilizzata è stata pulita con una piccola quantità eptano dopo la normale pulizia per rimuovere le eventuali tracce degli analiti apolari. I test per l'ottimizzazione del metodo hanno riguardato il tipo di fase stazionaria utilizzata nella cartuccia per l'SPE, il volume di soluzione da analizzare ed il tipo di solvente da impiegare per estrarre gli analiti dalla cartuccia per l'SPE. L'estrazione e l'analisi degli ftalati da soluzioni acquose che simulano l'urina è avvenuta dopo aver calibrato il GC-FID con soluzioni standard di ftalati in eptano per concentrazioni di 50, 75, 100, 125 e 150 ppm. Le curve di calibrazione che sono state ottenute direttamente sono risultate poco lineari (grafico 22) (grafico 23) inoltre una successiva analisi di uno standard di ftalati a 110 ppm ha dato un risultato con un errore eccessivo (tabella), per questo motivo si è adoperato uno standard interno.

| Curva di calibrazione | pendenza | intercetta | R ² | errore su campione 110 ppm (%) |
|-----------------------|----------|------------|----------------|--------------------------------|
| DMP | 2,496 | -45,944 | 0,983 | -15,62 |
| DEP | 3,143 | -11,614 | 0,943 | -1,83 |
| DPP | 3,483 | 0,644 | 0,985 | 13,08 |
| DBP | 3,108 | -9,875 | 0,864 | 21,20 |
| DEHP | 3,966 | 55,931 | 0,945 | 7,82 |
| DOP | 3,687 | 57,693 | 0,970 | -3,58 |
| DDP | 3,796 | -85,350 | 0,973 | 30,36 |

Tabella 12: linearità delle rette di calibrazione ed errore su un campione incognito

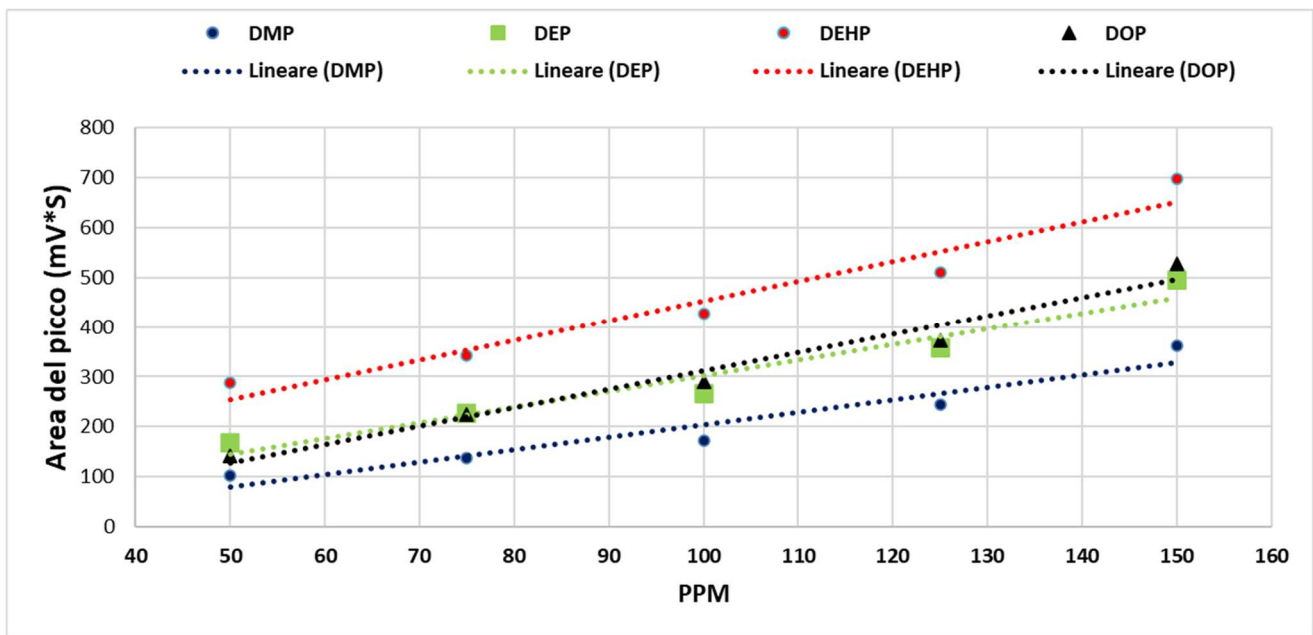


Grafico 22: curve di calibrazione degli ftalati

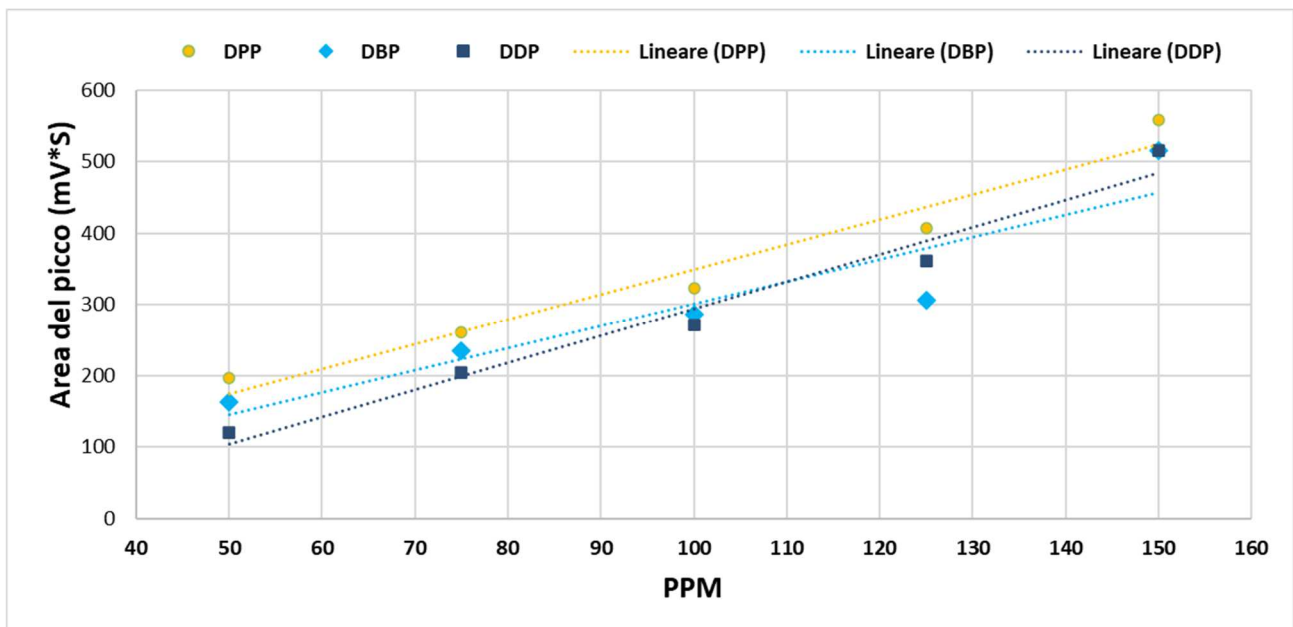


Grafico 23: curve di calibrazione degli ftalati

Il fenantrene è stato impiegato come standard interno per ridurre l'errore derivante dall'iniezione del campione, ed in ogni campione è stato aggiunto in concentrazione di 100 ppm solo prima dell'analisi con il GC-FID. L'impiego dello standard interno ha permesso di aumentare la linearità delle curve di calibrazione (grafico 24) (grafico 25) e permesso l'analisi di un campione incognito con un errore inferiore al 10% (tabella 13).

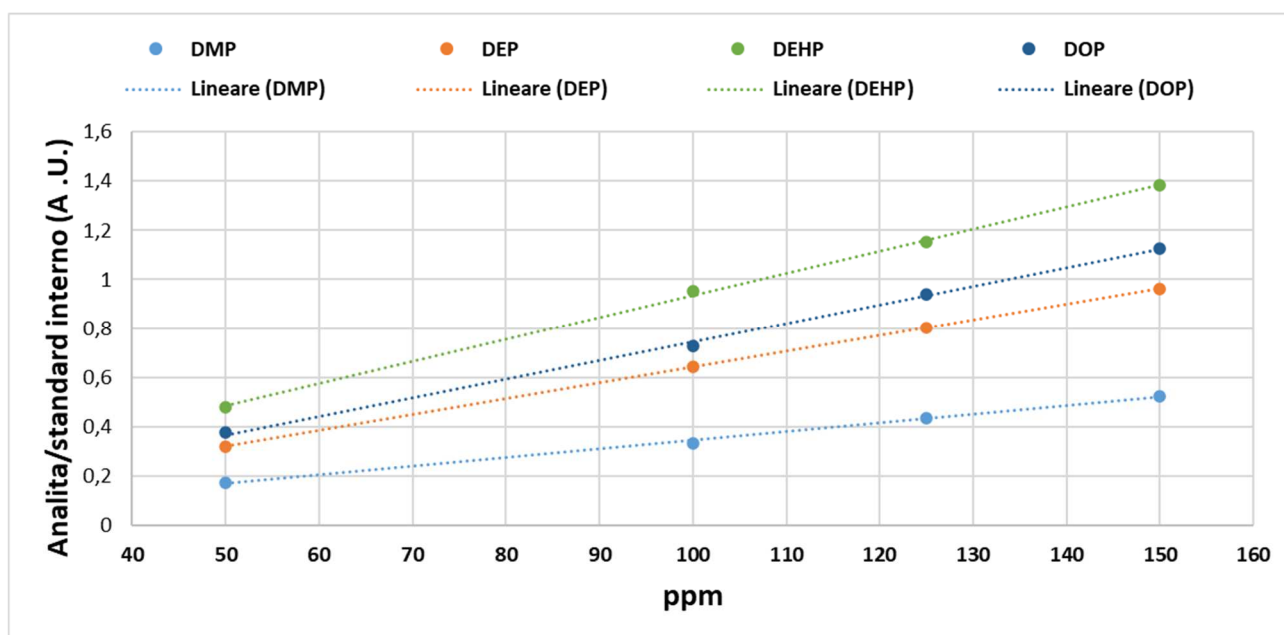


Grafico 24: curve di calibrazione normalizzate con lo standard interno (fenantrene)

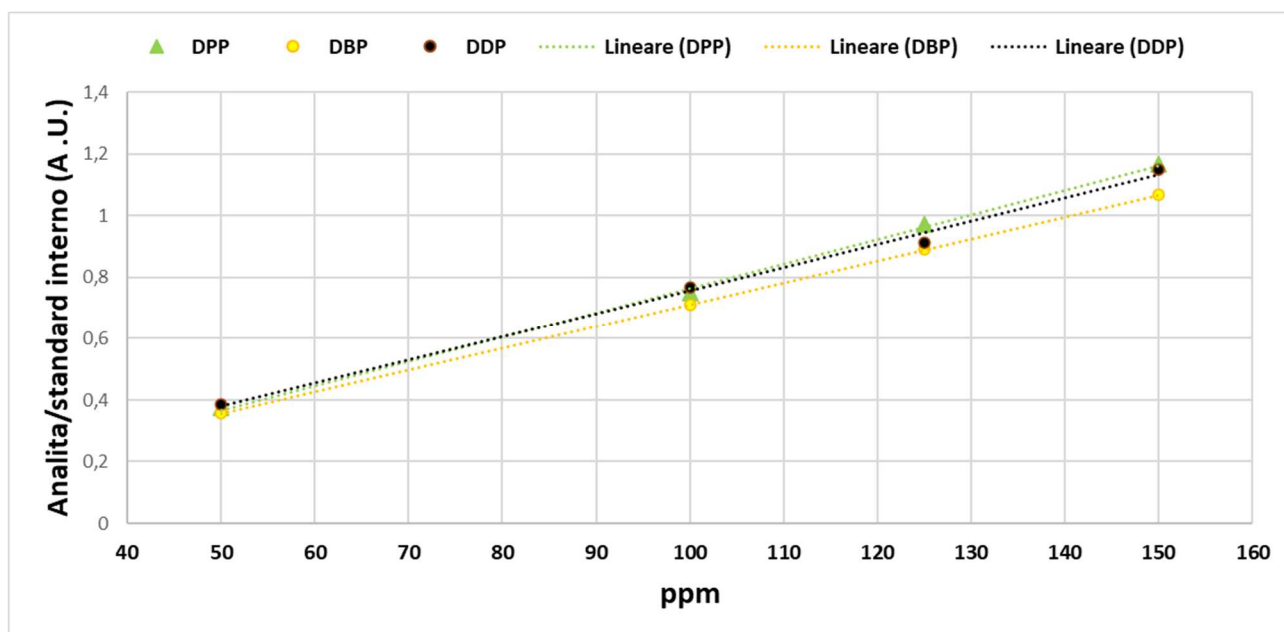


Grafico 24: curve di calibrazione normalizzate con lo standard interno (fenantrene)

| Nome | Sigla | pendenza | intercetta | R ² | errore su uno standard 110 ppm (%) |
|------------------------|-------|----------|------------|----------------|------------------------------------|
| dimetilftalato | DMP | 0,002 | 0,123 | 0,985 | 8,96 |
| dietilftalto | DEP | 0,005 | 0,12 | 0,967 | 3,38 |
| dipentilftalato | DPP | 0,007 | 0,117 | 0,996 | -7,68 |
| dibutilftalato | DBP | 0,005 | 0,127 | 0,988 | 9,29 |
| di(2-etil esil)ftalato | DEHP | 0,005 | 0,402 | 0,981 | 7,22 |
| dioctilftalato | DOP | 0,005 | 0,202 | 0,971 | 7,28 |
| didecilftalato | DDP | 0,005 | 0,223 | 0,975 | 9,83 |

Tabella 13: linearità delle rette di calibrazione ed errore su un campione incognito

La metodica di estrazione in fase solida degli ftalati è stata perfezionata con una serie di esperimenti dove si è cambiato solo uno dei parametri del processo. Il primo confronto è avvenuto per determinare con quale cartuccia SPE eseguire l'analisi. 100 ml di una soluzione acquosa che simula l'urina contenete gli ftalati alla concentrazione di 750 µg/L sono stati fatti passare attraverso una cartuccia contenente 100 mg di fase attiva alla velocità circa 1 mL/min, successivamente gli analiti sono stati estratti con 5 ml di eptano ed analizzati con il GC-FID. Il risultato dell'analisi (tabella 14) mostra le superiori prestazioni della fase attiva Oasis rispetto alla fase attiva C18, ma anche la difficoltà di avere recuperi significativi del DDP che è stato rilevato a cavallo del limite di quantificazione (LOQ, 50 ppm) con l'uso di una fase mobile Oasis, mentre non è stato neanche rilevato nell'esperimento con la fase mobile C18.

| Fase mobile | DMP (%) | DEP (%) | DPP (%) | DBP (%) | DEHP (%) | DOP (%) | DDP (%) |
|--------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|---------|
| 100 mg Oasis | 53,43 ± 4,5 | 65,97 ± 2,3 | 76,33 ± 5,9 | 62,19 ± 5,8 | 42,81 ± 3,1 | 35,84 ± 2,6 | ~LOQ |
| 100 mg C18 | <LOQ | 45,83± 1,6 | 52,74± 4,1 | 40,10± 3,7 | <LOQ | <LOD | <LOD |

Tabella 14: prove di recupero con l'estrazione in fase solida, LOQ 50 ppm, LOD stimato ~10 ppm

La seconda prova per sviluppare il metodo di analisi ha riguardato il solvente di estrazione degli analiti dalla cartuccia SPE; la scelta dei solventi è stata limitata dalla necessità di evitare solventi troppo volatili come l'acetone o cancerogeni come il benzene. 100 ml di una soluzione acquosa che simula l'urina contenete gli ftalati alla concentrazione di 750 µg/L sono stati fatti passare attraverso una cartuccia contenente 100 mg di fase attiva Oasis alla velocità circa 1 mL/min, successivamente gli analiti sono stati estratti con 5 ml di solvente ed analizzati con il GC-FID. I risultati di quest'analisi (tabella 15) mostrano che l'eptano è il miglior solvente per estrarre gli ftalati da una cartuccia Oasis.

| Solventi | DMP (%) | DEP (%) | DPP (%) | DBP (%) | DEHP (%) | DOP (%) | DDP (%) |
|--------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|---------|
| Eptano | 53,43 ± 4,5 | 65,97 ± 2,3 | 76,33 ± 5,9 | 62,19 ± 5,8 | 42,81 ± 3,1 | 35,84 ± 2,6 | ~LOQ |
| Acetonitrile | 39 ± 3,5 | <LOQ | <LOQ | 34±3,1 | <LOQ | <LOD | <LOD |
| Metanolo | <LOQ | <LOQ | <LOQ | 39±3,6 | <LOQ | <LOQ | <LOD |

Tabella 15: prove di recupero con l'estrazione in fase solida, LOQ 50 ppm, LOD stimato ~10 ppm

L'ultima prova per sviluppare il metodo di analisi ha riguardato il volume di campione da impiegare per l'analisi, per questo motivo sono state analizzate quattro diverse soluzioni acquose che simulano l'urina con diverse concentrazioni di ftalati in modo che la quantità di analita impiegato sia la stessa come la concentrazione massima di analita teoricamente estraibile con solvente (100 ppm): 200 mL di una soluzione 375 µg/L, 150 mL di una soluzione 500 µg/L, 100 mL di una soluzione 750 µg/L e 50 mL di una soluzione 1500 µg/L. Queste concentrazioni sono state scelte affinché la concentrazione massima teorica degli analiti in 1 µL di soluzione estratta sia 150 ppm. Le soluzioni sono state fatte passare attraverso una cartuccia contenente 100 mg di fase attiva Oasis alla velocità circa 1 mL/min, successivamente gli analiti sono stati estratti con 5 ml di eptano ed analizzati con il GC-FID. I risultati di queste analisi mostrano (tabella) che utilizzando 150 ml di soluzione si possono ottenere i recuperi massimi degli ftalati più polari, ma non si riescono ad analizzare gli ftalati più apolari.

| | DMP (%) | DEP (%) | DPP (%) | DBP (%) | DEHP (%) | DOP (%) | DDP (%) |
|--------|----------------|----------------|----------------|----------------|----------------|----------------|---------|
| 50 ml | 35,08 ± 3,1 | 49,79 ± 1,6 | 59,94 ± 4,6 | 42,05 ± 3,9 | <LOQ | <LOD | <LOD |
| 100 ml | 53,43 ± 4,5 | 65,97 ± 2,3 | 76,33 ± 5,9 | 62,19 ± 5,8 | 42,81 ± 3,1 | 35,84 ± 2,6 | ~LOQ |
| 150 ml | 85,29 ± 7,6 | 75,11 ± 2,5 | 79,17 ± 6,1 | 74,25 ± 6,9 | 34,45 ± 2,5 | <LOQ | <LOD |
| 200 ml | 51,13 ± 4,8 | 66,17 ± 2,2 | 73,33 ± 5,0 | 60,7 ± 5,1 | 39,18 ± 3,1 | <LOQ | <LOQ |

Tabella 15: prove di recupero con l'estrazione in fase solida, LOQ 50 ppm, LOD stimato ~10 ppm

In conclusione il risultato di queste prove ha mostrato che l'analisi degli ftalati è resa complicata dall'intervallo di polarità che caratterizza questa classe di composti, dal più polare dimetilftalato ai più apolari come il dioctilftalato ed il didecilftalato.

Conclusioni

La presenza delle microparticelle plastiche nell'ambiente è una scoperta relativamente recente ed i loro effetti sulla salute umana sono ancora poco compresi; tuttavia la scoperta di microplastiche nei tessuti umani sta spingendo la comunità scientifica ed i legislatori a porre una maggiore attenzione al problema dell'inquinamento da microplastiche ed è già stato dimostrato che l'esposizione umana alle microplastiche avviene per via gastro-intestinale e polmonare. I metodi per determinare la presenza delle microplastiche nel pulviscolo atmosferico, nelle acque, nel terreno e negli alimenti sono l'attuale obiettivo della ricerca scientifica sulle microplastiche, ma vi sono ancora delle controversie sulla definizione delle loro dimensioni. L'attività di ricerca svolta per questo Dottorato, e qui descritta, ha avuto come obiettivo l'ottimizzazione delle tecniche analitiche adatte a rilevare le microplastiche nelle differenti matrici. In particolare abbiamo preso in considerazione i fluidi biologici, l'aria ed il sale per uso alimentare, i primi per valutare l'entità dell'assunzione delle microplastiche, da correlare in seguito all'impatto sulla salute, l'aria come ovvio mezzo di trasmissione tramite la respirazione e il sale come alimento largamente utilizzato e quindi come mezzo di assunzione per via gastro-intestinale. Il lavoro di ricerca ha mostrato la complessità dell'analisi delle microplastiche, dovuta all'analisi di un insieme di particelle differenti sia dal punto di vista morfologico e dimensionale che dal punto di vista chimico, nonché alla necessità di dover operare con matrici molto differenti: il sale, l'aria, i fluidi biologici. I risultati dell'analisi di questi campioni hanno mostrato che per analizzare le microplastiche è necessario un approccio olistico in quanto l'utilizzo di un metodo di analisi che impieghi una sola tecnica strumentale tende a dare un risultato parziale dell'effettiva presenza delle microplastiche nel campione. In particolare l'impiego delle tecniche di imaging richiede un complesso pretrattamento del campione che permette l'analisi delle particelle grandi pochi micron, ma non consente l'analisi delle fibre lunghe più di 100 μm ; al contrario la microscopia ottica abbinata con la spettroscopia Raman può essere impiegata con un semplice pretrattamento del campione e permette di analizzare facilmente le fibre, ma non le microplastiche di piccole dimensioni. La spettroscopia Raman e la spettroscopia infrarossa in trasformata di Fourier (FT-IR) applicate alla tecnica di

imaging hanno dato risultati complementari: la prima ha rilevato principalmente le microplastiche composte dai polimeri più resistenti al rammollimento, come il PVC, mentre la seconda ha maggiormente rilevato i polimeri a bassa temperatura di rammollimento come il polietilene. Solo l'impiego delle varie tecniche di analisi permette di ottenere un risultato che sia indicativo della complessiva presenza delle microplastiche e delle loro caratteristiche. I risultati di queste analisi possono essere espressi come area coperta dalla microplastica (misurata mediante tecniche di imaging), in quanto è molto difficile determinare lo spessore della microparticella tramite la microscopia e quindi riportare i risultati come volume o addirittura determinarne la densità con precisione e riportare i risultati come massa. La difficoltà nel determinare lo spessore e la densità di ogni singola microplastica è dovuta al dover analizzare delle particelle parzialmente degradate, sia morfologicamente che chimicamente. Le varie tecniche di analisi applicate ai campioni di sale hanno mostrato la forte variabilità della presenza delle microplastiche ed hanno mostrato che il sale di miniera ha un contenuto di microplastiche inferiore rispetto al sale marino. L'analisi del pulviscolo atmosferico ha permesso di determinare l'elevato contenuto di microplastiche nell'aria di un impianto per il trattamento dei rifiuti plastici, molto superiore a quello di un laboratorio dove avviene la lavorazione della plastica. Lo sviluppo del metodo di analisi degli ftalati nelle urine, una classe di additivi della plastica la cui presenza è indicativa dell'esposizione dell'organismo alle microplastiche, ha mostrato come sia possibile effettuare la concentrazione di questi analiti contemporaneamente tramite l'estrazione in fase solida (SPE) nonostante le loro differenze di polarità; l'analisi degli ftalati è avvenuta con un gascromatografo con rilevatore a ionizzazione di fiamma (GC-FID). L'attività di ricerca sulle microplastiche è ancora agli inizi, i suoi sviluppi futuri riguarderanno i vari aspetti dell'inquinamento da microplastiche che non sono ancora completamente noti, come la loro tossicità e la loro diffusione nell'organismo umano, inoltre riguarderanno la loro presenza negli alimenti, come l'acqua in bottiglia, su cui già vi sono dei primi studi sul rilascio di microplastiche dalla bottiglia in plastica. Un importante obiettivo della ricerca sulle microplastiche sarà l'ottenere un protocollo di analisi delle microplastiche che permetta l'impiego di vari tipi di strumenti analitici, come la pirolisi

abbinata alla gascromatografia (py-GC-MS), l'imaging FT-IR e la spettroscopia Raman e che permetta un'efficace l'integrazione dei loro risultati per una valutazione complessiva di tutti i tipi di microplastiche. L'analisi delle microplastiche nell'organismo umano continuerà con l'individuazione di nuovi indicatori che permettano di valutare l'esposizione alle microplastiche tramite l'analisi delle urine. La precisa determinazione e la quantificazione della presenza delle microplastiche nell'ambiente, negli alimenti e nell'organismo umano sarà importante in quanto prossimamente saranno imposti dei valori soglia alla contaminazione da microplastiche per gli alimenti e gli ambienti di lavoro e sarà necessario disporre di un protocollo di analisi ufficiale. In conclusione la ricerca sulla contaminazione da microplastiche è ancora agli albori, ma ha grandi prospettive di sviluppo al fine di comprendere questo problema per poter proteggere efficacemente le persone e l'ambiente.

Ringraziamenti

Prof. Pasquale Avino, dipartimento di agricoltura, ambiente ed alimenti, Università degli studi di Campobasso

Dr. Alessandro Ciccola, dipartimento di fisica, Università La Sapienza

Dr. Luca Maurizi, dipartimento di ingegneria, Università di Aalborg, Danimarca

Dr. Ivan Notardonato, dipartimento di agricoltura, ambiente ed alimenti, Università degli studi di Campobasso

Prof. Alessandro Nucara, dipartimento di fisica, Università La Sapienza

Dr.ssa Donatella Pomanta, INAIL

Prof. Paolo Postorino, dipartimento di fisica, Università La Sapienza

Dr.ssa Maria Pia Sammartino, dipartimento di chimica, Università La Sapienza

Dr. Antoni Scoppettuolo, facoltà di ingegneria, Università La Sapienza

Dr. ssa Ilaria Silvestro, dipartimento di chimica, Università La Sapienza

Dr. ssa Elisa Sonogo, dipartimento di chimica, Università La Sapienza

Dr. Alvise Vianello, dipartimento di ingegneria, Università di Aalborg, Danimarca

Dr. Giovanni Visco, dipartimento di chimica, Università La Sapienza

Prof. Jes Vollertsen, dipartimento di ingegneria, Università di Aalborg, Danimarca

Bibliografia

- Aatmeeyata; Kaul, D.S.; Sharma, M. Traffic generated non-exhaust particulate emissions from concrete pavement: A mass and particle size study for two wheelers and small cars. *Atmos. Environ.* 2009, 43, 5691–5697.
- Abbasi, S., Keshavarzi, B., Moore, F., Turner, A., Kelly, F.J., Dominguez, A.O., Jaafarzadeh, N., 2019. Distribution and potential health impacts of microplastics and microrubbers in air and street dusts from Asaluyeh County, Iran. *Environ. Pollut.* 244, 153–164.
- Adibi, J. J., Whyatt, R. M., Williams, P. L., Calafat, A. M., Camann, D., Herrick, R., Hauser, R. (2008). Characterization of phthalate exposure among pregnant women assessed by repeat air and urine samples. *Environmental health perspectives*, 116(4), 467-473.
- Agha, K. R., Abughres, S. M., & Ramadan, A. M. (2002). Design methodology for a salt gradient solar pond coupled with an evaporation pond. *Solar Energy*, 72(5), 447-454.
- Alfonso, M. B., Takashima, K., Yamaguchi, S., Tanaka, M., & Isobe, A. (2021). Microplastics on plankton samples: Multiple digestion techniques assessment based on weight, size, and FTIR spectroscopy analyses. *Marine Pollution Bulletin*, 173, 113027.
- Aljaibachi, R., & Callaghan, A. (2018). Impact of polystyrene microplastics on *Daphnia magna* mortality and reproduction in relation to food availability. *PeerJ*, 6, e4601.
- Allen, S., Allen, D., Phoenix, V. R., Le Roux, G., Durántez Jiménez, P., Simonneau, A., Galop, D. (2019). Atmospheric transport and deposition of microplastics in a remote mountain catchment. *Nature Geoscience*, 12(5), 339-344. <https://doi.org/10.1038/s41561-019-0335-5>
- Almeshal, I., Tayeh, B. A., Alyousef, R., Alabduljabbar, H., Mohamed, A. M., & Alaskar, A. (2020). Use of recycled plastic as fine aggregate in cementitious composites: A review. *Construction and Building Materials*, 253, 119146. <https://doi.org/10.1016/j.conbuildmat.2020.119146>
- Alomar, C., Estarellas, F., & Deudero, S. (2016). Microplastics in the Mediterranean Sea: deposition in coastal shallow sediments, spatial variation, and preferential grain size. *Marine Environmental Research* 115, 1–10.
- Amato-Lourenço L.F., R. Carvalho-Oliveira, G.R. Júnior, L. dos Santos Galvão, R.A. Ando, T. Mauad Presence of airborne microplastics in human lung tissue *J. Hazard. Mater.*, 416 (2021), Article 126124
- Ambeck, J. R., Geyer, R., Wilcox, C., Siegler, T. R., Perryman, M., Andrady, A., Law, K. L. 2015
- Anagnosti, L., Varvaresou, A., Pavlou, P., Protopapa, E., & Carayanni, V. (2021). Worldwide actions against plastic pollution from microbeads and microplastics in

cosmetics focusing on European policies. Has the issue been handled effectively? *Marine Pollution Bulletin*, 162: 111883.

Anderson C.A., L.J. Appel, N. Okuda, I.J. Brown, Q. Chan, L. Zhao, H. Ueshima, H. Kesteloot, K. Miura, J.D. Curb, K. Yoshita, P. Elliott, M.E. Yamamoto, J. Stamler Dietary sources of sodium in China, Japan, the United Kingdom, and the United States, women and men aged 40 to 59 years: the INTERMAP study *J. Am. Diet. Assoc.*, 110 (2010), pp. 736-745

Andrady, A. L.; Neal, M. A., Applications and societal benefits of plastics. *Philosophical transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological sciences* 2009, 364, (1526), 1977-84

Andrady, A.L. (2017). The plastic in microplastics: a review. *Marine Pollution Bulletin* 119 (1), 12–22.

Andrady, Anthony L. "Microplastics in the marine environment." *Marine pollution bulletin* 62.8 (2011): 1596-1605.

Asimakopoulos, A.G.; Xue, J.; De Carvalho, B.P.; Iyer, A.; Abualnaja, K.O.; Yaghmoor, S.S.; Kumosani, T.A.Kannan, K. Urinary biomarkers of exposure to 57 xenobiotics and its association with oxidative stress in a population in Jeddah, Saudi Arabia. *Environ. Res.* 2016, 150, 573–581.

Avio, C. G., Gorbi, S., & Regoli, F. (2015). Experimental development of a new protocol for extraction and characterization of microplastics in fish tissues: first observations in commercial species from Adriatic Sea. *Marine Environmental Research*, 111, 18-26.

Baini, M., Martellini, T., Cincinelli, A., Campani, T., Minutoli, R., Panti, C., Fossi, M. C. (2017). First detection of seven phthalate esters (PAEs) as plastic tracers in superficial neustonic/planktonic samples and cetacean blubber. *Analytical Methods*, 9(9), 1512-1520.

Bakir A, Rowland SJ, Thompson RC (2012) Competitive sorption of persistent organic pollutants onto microplastics in the marine environment. *Mar Pollut Bull* 64:2782-2789

Bakir, A., O'Connor, I. A., Rowland, S. J., Hendriks, A. J., & Thompson, R. C. (2016). Relative importance of microplastics as a pathway for the transfer of hydrophobic organic chemicals to marine life. *Environmental pollution*, 219, 56-65.

Bakir, A., Rowland, S. J., & Thompson, R. C. (2014). Transport of persistent organic pollutants by microplastics in estuarine conditions. *Estuarine, Coastal and Shelf Science*, 140: 14–21.

Barboza, L. G. A., Vethaak, A. D., Lavorante, B. R., Lundebye, A. K., & Guilhermino, L. (2018). Marine microplastic debris: An emerging issue for food security, food safety and human health. *Marine pollution bulletin*, 133, 336-348.

Barletta, M., Lima, A. R., & Costa, M. F. (2019). Distribution, sources and consequences of nutrients, persistent organic pollutants, metals and microplastics in South American estuaries. *Science of the Total Environment*, 651, 1199-1218.

- Barnes, D. K. A., Biodiversity - Invasions by marine life on plastic debris. *Nature* 2002, 416, (6883), 808-809.
- Becker, R., Altmann, K., Sommerfeld, T., & Braun, U. (2020). Quantification of microplastics in a freshwater suspended organic matter using different thermoanalytical methods—outcome of an interlaboratory comparison. *Journal of Analytical and Applied Pyrolysis*, 148, 104829.
- Bellas, J., Martínez-Armental, J., Martínez-Cámara, A., Besada, V., & Martínez-Gómez, C. (2016). Ingestion of microplastics by demersal fish from the Spanish Atlantic and Mediterranean coasts. *Marine pollution bulletin*, 109(1), 55-60
- Besseling, E.; Wegner, A.; Foekema, E. M.; van den Heuvel-Greve, M. J.; Koelmans, A. A., Effects of Microplastic on Fitness and PCB Bioaccumulation by the Lugworm *Arenicola marina* (L.). *Environmental Science & Technology* 2013, 47, (1), 593-600.
- Bianco, A., & Passananti, M. (2020). Atmospheric micro and nanoplastics: An enormous microscopic problem. *Sustainability*, 12(18), 7327.
- Bioplastics market data 2018 https://www.european-bioplastics.org/wp-content/uploads/2016/02/Report_Bioplastics-Market-Data_2018.pdf
- Bom, Fabio Cavalca, and Fabian Sá. "Concentration of microplastics in bivalves of the environment: a systematic review." *Environmental Monitoring and Assessment* 193.12 (2021): 1-30.
- Boucher, Julien, and Damien Friot. *Primary microplastics in the oceans: a global evaluation of sources*. Vol. 10. Gland, Switzerland: Iucn, 2017.
- Braun, T., Ehrlich, L., Henrich, W., Koepfel, S., Lomako, I., Schwabl, P., & Liebmann, B. (2021). Detection of microplastic in human placenta and meconium in a clinical setting. *Pharmaceutics*, 13(7), 921.
- Browne, M. A., Niven, S. J., Galloway, T. S., Rowland, S. J., & Thompson, R. C. (2013). Microplastic moves pollutants and additives to worms, reducing functions linked to health and biodiversity. *Current biology*, 23: 2388–2392.
- Browne, M. A.; Crump, P.; Niven, S. J.; Teuten, E.; Tonkin, A.; Galloway, T.; Thompson, R., Accumulation of Microplastic on Shorelines Worldwide: Sources and Sinks. *Environmental Science & Technology* 2011, 45, (21), 9175-9179.
- Browne, M., Dissanayake, A., Galloway, T., Lowe, D., & Thompson, R. (2008). Ingested microscopic plastic translocates to the circulatory system of the mussel, *Mytilus edulis*. *Environ. Sci. Technol.* 42, 5026–5031.
- Browning, S., Beymer-Farris, B., & Seay, J. R. (2021). Addressing the challenges associated with plastic waste disposal and management in developing countries. *Current Opinion in Chemical Engineering*, 32, 100682.

- Buiarelli, F., Di Filippo, P., Massimi, L., Pomata, D., Riccardi, C., Simonetti, G., & Sonogo, E. (2019). Ultrafine, fine and coarse airborne particle mass concentration in workplaces. *Atmospheric Pollution Research*, 10(5), 1685-1690.
- Cai, H., Du, F., Li, L., Li, B., Li, J., & Shi, H. (2019). A practical approach based on FT-IR spectroscopy for identification of semi-synthetic and natural celluloses in microplastic investigation. *Science of the Total Environment*, 669, 692-701.
- Cai, L., Wang, J., Peng, J., Tan, Z., Zhan, Z., Tan, X., & Chen, Q. (2017). Characteristic of microplastics in the atmospheric fallout from Dongguan city, China: preliminary research and first evidence. *Environmental Science and Pollution Research*, 24(32), 24928-24935.
- Canesi, L., Ciacci, C., Bergami, E., Monopoli, M. P., Dawson, K. A., Papa, S., Corsi, I. (2015). Evidence for immunomodulation and apoptotic processes induced by cationic polystyrene nanoparticles in the hemocytes of the marine bivalve *Mytilus*. *Marine environmental research*, 111, 34-40.
- Carbery, M., O'Connor, W., & Palanisami, T. (2018). Trophic transfer of microplastics and mixed contaminants in the marine food web and implications for human health. *Environment international*, 115, 400-409.
- Carnevali, O., Tosti, L., Speciale, C., Peng, C., Zhu, Y., & Maradonna, F. (2010). DEHP impairs zebrafish reproduction by affecting critical factors in oogenesis. *PLoS One*, 5: e10201
- Castañeda RA, Avlijas S, Simard, MA, Ricciardi A (2014) Microplastic pollution in St. Lawrence River sediments. *Can J Fish Aquat Sci* 71:1767-1771
- Chamas, A., Moon, H., Zheng, J., Qiu, Y., Tabassum, T., Jang, J. H., Suh, S. (2020). Degradation rates of plastics in the environment. *ACS Sustainable Chemistry & Engineering*, 8(9), 3494-3511.
- Chen Q., J. Gao, H. Yu, H. Su, Y. Yang, Y. Cao, Q. Zhang, Y. Ren, H. Hollert, H. Shi, C. Chen An emerging role of microplastics in the etiology of lung ground glass nodules *Environ. Sci. Eur.*, 34 (1) (2022), pp. 1-15
- Chen, G. & Fu, Z., Yang, H., & Wang, J. (2020). An overview of analytical methods for detecting microplastics in the atmosphere. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 130, 115981.
- Chen, G., Feng, Q., & Wang, J. (2020). Mini-review of microplastics in the atmosphere and their risks to humans. *Science of the Total Environment*, 703, 135504.
- Cho, Y., Shim, W. J., Jang, M., Han, G. M., & Hong, S. H. (2019). Abundance and characteristics of microplastics in market bivalves from South Korea. *Environmental Pollution*, 245, 1107-1116
- Claessens, M.; Van Cauwenberghe, L.; Vandegehuchte, M. B.; Janssen, C. R., New techniques for the detection of microplastics in sediments and field collected organisms. *Mar Pollut Bull* 2013, 70, (1-2), 227-233

Clausen, P. A., Hansen, V., Gunnarsen, L., Afshari, A., & Wolkoff, P. (2002). Emission of phthalates from PVC flooring in two very different test chambers. *Indoor Air*, 2, 932-937.

CODEX STANDARD FOR FOOD GRADE SALT CX STAN 150-1985, Rev. 1-1997
Amend. 1-1999, Amend. 2-2001

Colabuono, F. I.; Barquete, V.; Domingues, B. S.; Montone, R. C., Plastic ingestion by Procellariiformes in Southern Brazil. *Mar Pollut Bull* 2009, 58, (1), 93-96.

Colacino Justin, A.; Harris, T.R.; Schecter, A. Dietary intake Is associated with phthalate body burden in a nationally representative sample. *Environ. Health Perspect.* 2010, 118, 998–1003.

Cole, M., Lindeque, P., Halsband, C., & Galloway, T.S. (2011). Microplastics as contaminants in the marine environment: a review. *Mar. Pollut. Bull.* 62, 2588–2597.

Cole, M., Webb, H., Lindeque, P. K., Fileman, E. S., Halsband, C., & Galloway, T. S. (2014). Isolation of microplastics in biota-rich seawater samples and marine organisms. *Scientific reports*, 4(1), 1-8.

Commission Regulation (EU) No 10/2011 of 14 January 2011 on plastic materials and articles intended to come into contact with food Text with EEA relevance

Commissione Europea (2017). Commission Decision 2017/848 of 17 May 2017 laying down criteria and methodological standards on good environmental status of marine waters and specifications and standardised methods for monitoring and assessment and repealing Decision 2010/477/EU. *Official Journal of the European Union*, L125, 43–74.

Corcoran PL, Norris T, Ceccanese T, Walzak MJ, Helm PA, Marvin CH (2015) Hidden plastics of Lake Ontario, Canada and their potential preservation in the sediment record. *Environ Pollut* 204:17-25

Cornelius, S. E. (1975). Marine turtle mortalities along the pacific coast of Costa Rica. *Mortalidad de tortugas marinas a lo largo de la costa pacífica de Costa Rica. Copeia*, 1975: 186–187

Courtene-Jones, W., Quinn, B., Murphy, F., Gary, S. F., & Narayanaswamy, B. E. (2017). Optimisation of enzymatic digestion and validation of specimen preservation methods for the analysis of ingested microplastics. *Analytical Methods*, 9(9), 1437-1445.

Cox, K.D., Covernton, G.A., Davies, H.L., Dower, J.F., Juanes, F., & Dudas, S.E. (2019). Human consumption of microplastics. *Environ. Sci. Technol.* 53 (12), 7068–7074.

Cuthbert, R. N., Al-Jaibachi, R., Dalu, T., Dick, J. T., & Callaghan, A. (2019). The influence of microplastics on trophic interaction strengths and oviposition preferences of dipterans. *Science of The Total Environment*, 651: 2420–2423.

Cutroneo, L., Reboa, A., Besio, G., Borgogno, F., Canesi, L., Canuto, S., Capello, M. (2020). Microplastics in seawater: sampling strategies, laboratory methodologies, and

identification techniques applied to port environment. *Environmental Science and Pollution Research*, 27(9), 8938-8952.

D'Ambrières Woldemar, *Plastics recycling worldwide: current overview and desirable changes*, <https://journals.openedition.org/factsreports/5102> ISSN: 1867-8521, *Field Actions Science Reports*, 19 (2019)

Dahl, A.; Gharibi, A.; Swietlicki, E.; Gudmundsson, A.; Bohgard, M.; Ljungman, A.; Blomqvist, G.; Gustafsson, M. Traffic-generated emissions of ultrafine particles from pavement-tire interface. *Atmos. Environ.* 2006, 40, 1314–1323.

Davidson, K., & Dudas, S. E. (2016). Microplastic ingestion by wild and cultured Manila clams (*Venerupis philippinarum*) from Baynes Sound, British Columbia. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, 71(2), 147-156.

Davison, P.; Asch, R. G., *Plastic ingestion by mesopelagic fishes in the North Pacific Subtropical Gyre*. *Mar Ecol-Prog Ser* 2011, 432, 173-180

Davison, S. M., White, M. P., Pahl, S., Taylor, T., Fielding, K., Roberts, B. R., Economou, T., McMeel, O., Kellett, P., & Fleming, L. E. (2021). Public concern about, and desire for research into, the human health effects of marine plastic pollution: Results from a 15-country survey across Europe and Australia. *Global Environmental Change*, 102309.

DDL 2582, Senato della Repubblica Italiana, https://www.senato.it/japp/bgt/showdoc/17/DDLPRES/0/993025/index.html?part=ddlpres_ddlpres1-articolato_articolato1

Dekiff J.H., D. Remy, J. Klasmeier, E. Fries Occurrence and spatial distribution of microplastics in sediments from Norderney *Environ. Pollut.*, 186 (2014), pp. 248-256

Deng, Y., Yan, Z., Shen, R., Huang, Y., Ren, H., & Zhang, Y. (2021). Enhanced reproductive toxicities induced by phthalates contaminated microplastics in male mice (*Mus musculus*). *Journal of Hazardous Materials*, 406, 124644.

Deng, Y., Zhang, Y., Lemos, B., & Ren, H. (2017). Tissue accumulation of microplastics in mice and biomarker responses suggest widespread health risks of exposure. *Scientific reports*, 7(1), 1-10.

Devriese, L. I.; van der Meulen, M. D.; Maes, T.; Bekaert, K.; Paul-Pont, I.; Frère, L.; Robbens, J.; & Vethaak, A. D. (2015). Microplastic contamination in brown shrimp (*Crangon crangon*, Linnaeus 1758) from coastal waters of the Southern North Sea and Channel area. *Mar. Pollut. Bull*, 98 (1), 179–187

Dickson, A G, and Goyet, C. *Handbook of methods for the analysis of the various parameters of the carbon dioxide system in sea water*. Version 2. United States: N. p., 1994. doi:10.2172/10107773.

Directive 2005/84/EC of the European Parliament and of the Council of 14 December 2005 amending for the 22nd time Council Directive 76/769/EEC on the approximation of the laws, regulations and administrative provisions of the Member States relating to

restrictions on the marketing and use of certain dangerous substances and preparations (phthalates in toys and childcare articles)

Directive 2008/56/EC European Parliament and the Council, Directive 2008/56/EC of the European Parliament and of the Council of 17 June 2008 establishing a framework for community action in the field of marine environmental policy (Marine Strategy Framework Directive). In Brussels, 2008.

Dirven, H. A. A. M., Van Den Broek, P. H. H., Arends, A. M. M., Nordkamp, H. H., De Lepper, A. J. G. M., Henderson, P. T., & Jongeneelen, F. J. (1993). Metabolites of the plasticizer di (2-ethylhexyl) phthalate in urine samples of workers in polyvinylchloride processing industries. *International archives of occupational and environmental health*, 64(8), 549-554.

Dris, R., Gasperi, J., Mirande, C., Mandin, C., Guerrouache, M., Langlois, V., Tassin, B., 2017. A first overview of textile fibers, including microplastics, in indoor and outdoor environments. *Environ. Pollut.* 221, 453–458.

Dris, R., Gasperi, J., Rocher, V., Mohamed, S., Tassin, B., 2015. Microplastic contamination in an urban area: a case study in Greater Paris. *Environ. Chem.* 12.

Dris, R., Gasperi, J., Saad, M., Mirande, C., & Tassin, B. (2016). Synthetic fibers in atmospheric fallout: a source of microplastics in the environment? *Marine pollution bulletin*, 104(1-2), 290-293.

Du F., H. Cai, Q. Zhang, Q. Chen, H. Shi Microplastics in take-out food containers J. *Hazard. Mater.*, 399 (2020), p. 122969, 10.1016/j.jhazmat.2020.122969

Duan, Zhenghua, et al. "Diet preference of zebrafish (*Danio rerio*) for bio-based polylactic acid microplastics and induced intestinal damage and microbiota dysbiosis." *Journal of Hazardous Materials* 429 (2022): 128332.

Eagles-Smith, C. A., Silbergeld, E. K., Basu, N., Bustamante, P., Diaz-Barriga, F., Hopkins, W. A., Kidd, K. A., & Nyland, J. F. (2018). Modulators of mercury risk to wildlife and humans in the context of rapid global change. *Ambio*, 47(2), 170-197.

ECHA Annex XV Restriction report: proposal for a restriction, intentionally added microplastics, 22/8/2019 <https://echa.europa.eu/documents/10162/05bd96e3-b969-0a7c-c6d0-441182893720>

ECHA Committee for Risk Assessment (RAC), Committee for Socio-economic Analysis (SEAC) Opinion on an Annex XV dossier proposing restrictions on intentionally added microplastics ECHA/SEAC/RES-O-0000006901-74-01/F 10/12/2020

ECHA <https://echa.europa.eu/>, European Chemicals Agency, 2022

EDWARD J. CARPENTER K. L. SMITH, JR. Plastics on the Sargasso Sea Surface, *Science*, 1972 Colton Jr, John B., Bruce R. Burns, and Frederick D. Knapp. "Plastic Particles in Surface Waters of the Northwestern Atlantic: The abundance, distribution,

source, and significance of various types of plastics are discussed." *Science* 185:4150 (1974): 491-497.

Edwards, H. G. M., Johnson, A. F., & Lewis, I. R. (1993). Applications of Raman spectroscopy to the study of polymers and polymerization processes. *Journal of Raman spectroscopy*, 24(8), 475-483.

Eek, E., Cornelissen, G., & Breedveld, G. D. (2010). Field measurement of diffusional mass transfer of HOCs at the sediment-water interface. *Environmental science & technology*, 44(17), 6752-6759.

Eerkes-Medrano D, Thompson RC, Aldridge DC (2015) Microplastics in freshwater systems: a review of the emerging threats, identification of knowledge gaps and prioritisation of research needs. *Water Res* 75:63-82

EFSA (2016). Panel on Contaminants in the Food Chain (CONTAM). Presence of microplastics and nanoplastics in food, with particular focus on seafood. *Efsa Journal*, 14(6), e04501.

Endo S, Takizawa R, Okuda K, Takada H, Chiba K, Kanehiro H, Date T (2005) Concentration of polychlorinated biphenyls (PCBs) in beached resin pellets: variability among individual particles and regional differences. *Mar Pollut Bull* 50:1103-1114

Environmental Pollution 225 (2017) 223e231 Microplastic contamination in Lake Winnipeg, Canada* Philip J. Anderson a, 1, Sarah Warrack b, Victoria Langen c, Jonathan K. Challis d, Mark L. Hanson e, Michael D. Rennie a, b, c, *

Eriksen, M., Lebreton, L. C., Carson, H. S., Thiel, M., Moore, C. J., Borerro, J. C., Galgani, F., Ryan, P. G., Reisser, J., 2014. "Plastic pollution in the world's oceans: more than 5 trillion plastic pieces weighing over 250,000 tons afloat at sea."

Eriksen, M., Mason, S., Wilson, S., Box, C., Zellers, A., Edwards, W., Amato, S. (2013). Microplastic pollution in the surface waters of the Laurentian Great Lakes. *Marine pollution bulletin*, 77(1-2), 177-182.

EUR-Lex - 52018DC0028, 16/01/2018, 4,2 <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/IT/ALL/?uri=CELEX%3A52018DC0028>

European Commission Directorate-General Health and Consumers Survey on members states' implementation of the EU salt reduction framework (Web. 5 June 2014.) http://ec.europa.eu/health/nutrition_physical_activity/docs/salt_report1_en.pdf

Farhat, S. C., Silva, C. A., Orione, M. A. M., Campos, L. M., Sallum, A. M., & Braga, A. L. (2011). Air pollution in autoimmune rheumatic diseases: a review. *Autoimmunity reviews*, 11(1), 14-21.

Farrell, P., & Nelson, K. (2013). Trophic level transfer of microplastic: *Mytilus edulis* (L.) to *Carcinus maenas* (L.). *Environmental Pollution*, 177, 1-3.

Fischer EK, Paglialonga L, Czech E, Tamminga M (2016) Microplastic pollution in lakes and lake shoreline sediments – a case study on Lake Bolsena and Lake Chiusi (central Italy). *Environ Pollut* 213:648-657

Fischer, M., & Scholz-Böttcher, B. M. (2017). Simultaneous trace identification and quantification of common types of microplastics in environmental samples by pyrolysis-gas chromatography–mass spectrometry. *Environmental science & technology*, 51(9), 5052-5060.

Foekema, E. M., De Gruijter, C., Mergia, M. T., van Franeker, J. A., Murk, A. J., Koelmans, A. A. (2013). Plastic in North Sea Fish. *Environ. Sci. Technol.* 47 (15), 8818–8824.

Fossi, M. C., Panti, C., Guerranti, C., Coppola, D., Giannetti, M., Marsili, L., & Minutoli, R. (2012). Are baleen whales exposed to the threat of microplastics? A case study of the Mediterranean fin whale (*Balaenoptera physalus*). *Marine pollution bulletin*, 64(11), 2374-2379.

Frederiksen, H., Skakkebaek, N. E., & Andersson, A. M. (2007). Metabolism of phthalates in humans. *Molecular nutrition & food research*, 51(7), 899-911.

Frère, L., Paul-Pont, I., Moreau, J., Soudant, P., Lambert, C., Huvet, A., & Rinnert, E. (2016). A semi-automated Raman micro-spectroscopy method for morphological and chemical characterizations of microplastic litter. *Marine Pollution Bulletin*, 113(1-2), 461-468.

Fries, E., Dekiff, J. H., Willmeyer, J., Nuelle, M. T., Ebert, M., & Remy, D. (2013). Identification of polymer types and additives in marine microplastic particles using pyrolysis-GC/MS and scanning electron microscopy. *Environmental science: processes & impacts*, 15(10), 1949-1956.

Furukuma, Shunji, and Nobuyoshi Fujii. "In vitro cytotoxicity evaluation of plastic marine debris by colony-forming assay." *Japanese Journal of Environmental Toxicology* 19.2 (2016): 71-81.

Galgani F, Hanke G, Werner S, De Vrees L (2013) Marine litter within the European Marine Strategy Framework Directive. *ICES J Mar Sci* 70:1055-1064

Galgani, F., Giorgetti, A., Vinci, M., Le Moigne, M., Moncoiffe, G., Brosich, A., Molina, E., Lipizer, M., Holdsworth, N., Schlitzer, R., Hanke, G., & Schaap, D. (2017). Proposal for gathering and managing data sets on marine micro-litter on a European scale.

Galloway, T.S. (2015). Micro and nanoplastics and human health. In: Bergmann, M. (Ed.), *Marine Anthropogenic Litter*. 2015 Springer, New York (343–366 p).

Gaston, E., Woo, M., Steele, C., Sukumaran, S., & Anderson, S. (2020). Microplastics differ between indoor and outdoor air masses: insights from multiple microscopy methodologies. *Applied spectroscopy*, 74(9), 1079-1098.

- Geiser, M., Rothen-Rutishauser, B., Kapp, N., Schürch, S., Kreyling, W., Schulz, H., Gehr, P. (2005). Ultrafine particles cross cellular membranes by nonphagocytic mechanisms in lungs and in cultured cells. *Environmental health perspectives*, 113(11), 1555-1560.
- Germanov, E. S., Marshall, A. D., Bejder, L., Fossi, M. C., & Loneragan, N. R. (2018). Microplastics: no small problem for filter-feeding megafauna. *Trends in ecology & evolution*, 33: 227–232.
- GESAMP (2015). Sources, fate and effects of microplastics in the marine environment: a global assessment. (P. J. Kershaw, ed.). (IMO/FAO/UNESCO-IOC/UNIDO/WMO/IAEA/UN/UNEP/UNDP Joint Group of Experts on the Scientific Aspects of Marine Environmental Protection). Rep. Stud. GESAMP No. 90, 96 pp.
- GESAMP (2016), Group of Experts on the Scientific Aspects of Marine Environmental Protection, International Maritime Organization (IMO), Sources, Fate and Effects of Microplastics in the Marine Environment (Part 2) ISSN: 1020-4873
- GESAMP (2019). Guidelines on the monitoring and assessment of plastic litter and microplastics in the ocean. In P.J Kershaw., A. Turra, & F. Galgani (Eds.), (IMO/FAO/UNESCO-IOC/UNIDO/WMO/IAEA/UN/UNEP/UNDP/ISA Joint Group of Experts on the Scientific Aspects of Marine Environmental Protection). Rep. Stud. GESAMP No. 99, 130p.
- Geyer R, Jambeck JR, Law KL (2017) Production, use, and fate of all plastics ever made. *Sci Adv* 3: e1700782
- Giuliani, A., Zuccarini, M., Cichelli, A., Khan, H., & Reale, M. (2020). Critical review on the presence of phthalates in food and evidence of their biological impact. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 17(16), 5655.
- Gouin, T., Roche, N., Lohmann, R., & Hodges, G. (2011). A thermodynamic approach for assessing the environmental exposure of chemicals absorbed to microplastic. *Environmental Science & Technology*, 45: 1466–1472.
- Gregory, M. R., *Plastics and South Pacific Island shores: environmental implications.* *Ocean Coast Manage* 1999, 42, (6–7), 603-615
- Gündoğdu, S. (2018). Contamination of table salts from Turkey with microplastics. *Food Additives & Contaminants: Part A*, 35(5), 1006-1014.
- Guo, Y. & Wu, Q.; Kannan, K. Phthalate metabolites in urine from China, and implications for human exposures. *Environ. Int.* 2011, 37, 893–898
- Guo, Y.; Alomirah, H.; Cho, H.-S.; Minh, T.B.; Mohd, M.A.; Nakata, H.; Kannan, K. Occurrence of phthalate metabolites in human urine from several Asian countries. *Environ. Sci. Technol.* 2011, 45, 3138–3144.
- Guyton, Arthur C.; Hall, John E. (2006). *Textbook of Medical Physiology*. Philadelphia: Elsevier Saunders. pp. 316–317. ISBN 978-0-7216-0240-0.

- Haap, J., Classen, E., Beringer, J., Mecheels, S., & Gutmann, J. S. (2019). Microplastic fibers released by textile laundry: a new analytical approach for the determination of fibers in effluents. *Water*, 11(10), 2088.
- Hahladakis, J. N., Velis, C. A., Weber, R., Iacovidou, E., & Purnell, P. (2018). An overview of chemical additives present in plastics: migration, release, fate and environmental impact during their use, disposal and recycling. *Journal of hazardous materials*, 344, 179-199.
- Hamer, J.; Gutow, L.; Kohler, A.; Saborowski, R., Fate of microplastics in the marine isopod *Idotea emarginata*. *Environ. Sci. Technol.* 2014, 48, (22), 13451-8.
- Hanvey, J. S., Lewis, P. J., Lavers, J. L., Crosbie, N. D., Pozo, K., & Clarke, B. O. (2017) A review of analytical techniques for quantifying microplastics in sediments. *Anal. Methods*, 9 (9), 1369–1383.
- Haraway, D. (2015). Anthropocene, capitalocene, plantationocene, chthulucene: Making kin. *Environmental humanities*, 6: 159–165.
- Hartmann, N. B., Rist, S., Bodin, J., Jensen, L. H., Schmidt, S. N., Mayer, P., Meibom, A., & Baun, A. (2017). Microplastics as vectors for environmental contaminants: exploring sorption, desorption, and transfer to biota. *Integrated environmental assessment and management*, 13(3), 488-493.
- Hashem, K. M., He, F. J., Jenner, K. H., & MacGregor, G. A. (2014). Cross-sectional survey of salt content in cheese: a major contributor to salt intake in the UK. *BMJ open*, 4(8), e005051.
- Heindel, J. J., Powell, C. J., Phthalate ester effects on rat Ser-toli cell function in vitro: Effects of phthalate side chain and age of animal, *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 1992, 115, 116–123
- Hermsen, E., Mintenig, S. M., Besseling, E., & Koelmans, A. A. (2018). Quality criteria for the analysis of microplastic in biota samples: a critical review. *Environmental science & technology*, 52(18), 10230-10240.
- Hermsen, E., Pompe, R., Besseling, E., & Koelmans, A. A. (2017). Detection of low numbers of microplastics in North Sea fish using strict quality assurance criteria. *Marine pollution bulletin*, 122(1-2), 253-258.
- Hidalgo-Ruz V, Gutow L, Thompson RC, Thiel M (2012) Microplastics in the marine environment: a review of the methods used for identification and quantification. *Environ Sci Technol* 46: 3060-3075
- Hillenbrand, T.; Toussaint, D.; Böhm, E.; Fuchs, S.; Scherer, U.; Rudolphi, A.; Hoffmann, M.; Kreißig, J.; Kotz, C. Einträge von Kupfer, Zink und Blei in Gewässer und Böden—Analyse der Emissionspfade und Möglicher Emissionsminderungsmaßnahmen; Umweltbundesamt: Dessau, Germany, 2005

- Hintersteiner, I., Himmelsbach, M., & Buchberger, W. W. (2015). Characterization and quantitation of polyolefin microplastics in personal-care products using high-temperature gel-permeation chromatography. *Analytical and bioanalytical chemistry*, 407(4), 1253-1259.
- Hirai, H., Takada, H., Ogata, Y., Yamashita, R., Mizukawa, K., Saha, M., Ward, M. W. (2011). Organic micropollutants in marine plastics debris from the open ocean and remote and urban beaches. *Marine pollution bulletin*, 62(8), 1683-1692.
- Högberg, J.; Hanberg, A.; Berglund, M.; Skerfving, S.; Remberger, M.; Calafat, A.M.; Filipsson, A.F.; Jansson, B.; Johansson, N.; Appelgren, M.; et al. Phthalate diesters and their metabolites in human breast milk, blood or serum, and urine as biomarkers of exposure in vulnerable populations. *Environ. Health Perspect.* 2008, 116, 334–339
- Horton, Alice A., and Simon J. Dixon. "Microplastics: An introduction to environmental transport processes." *Wiley Interdisciplinary Reviews: Water* 5.2 (2018): e1268..
- Horvatits, T., Tamminga, M., Liu, B., Sebode, M., Carambia, A., Fischer, L., Fischer, E. K. (2022). Microplastics detected in cirrhotic liver tissue. *EBioMedicine*, 82, 104147.
- Huang, L., Neal, B., Dunford, E., Ma, G., Wu, J. H., Crino, M., & Trevena, H. (2016). Completeness of nutrient declarations and the average nutritional composition of pre-packaged foods in Beijing, China. *Preventive medicine reports*, 4, 397-403.
- Ibrahim Y.S., S. Tuan Anuar, A.A. Azmi, W.M.A. Wan Mohd Khalik, S. Lehata, S.R. Hamzah, D. Ismail, Z.F. Ma, A. Dzulkarnaen, Z. Zakaria, N. Mustaffa Detection of microplastics in human colectomy specimens *JGH Open*, 5 (1) (2021), pp. 116-121
- Inguglia, E. S., Zhang, Z., Tiwari, B. K., Kerry, J. P., & Burgess, C. M. (2017). Salt reduction strategies in processed meat products—A review. *Trends in Food Science & Technology*, 59, 70-78.
- Jadhav, E. B., Sankhla, M. S., Bhat, R. A., & Bhagat, D. S. (2021). Microplastics from food packaging: An overview of human consumption, health threats, and alternative solutions. *Environmental Nanotechnology, Monitoring & Management*, 16, 100608.
- Jambeck, J. R., Geyer, R., Wilcox, C., Siegler, T. R., Perryman, M., Andrady, A., Narayan, R., & Law, K. L. (2015). Plastic waste inputs from land into the ocean. *Science*, 347: 768–771
- Jenner, L. C., Rotchell, J. M., Bennett, R. T., Cowen, M., Tentzeris, V., & Sadofsky, L. R. (2022). Detection of microplastics in human lung tissue using μ FTIR spectroscopy. *Science of The Total Environment*, 831, 154907.
- John E. Weinstein, Jack L. Dekle, Rachel R. Leads, Rebecca A. Hunter, Degradation of bio-based and biodegradable plastics in a salt marsh habitat: Another potential source of microplastics in coastal waters, *Marine Pollution Bulletin*, Volume 160, 2020, ISSN 0025-326X, <https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2020.111518>.

- Kale, S. K., Deshmukh, A. G., Dudhare, M. S., & Patil, V. B. (2015). Microbial degradation of plastic: a review. *Journal of Biochemical Technology*, 6(2), 952-961.
- Kelly, F. J. and Fussell, J. C.: Size, Source and Chemical Composition as Determinants of Toxicity Attributable to Ambient Particulate Matter, *Atmos. Environ.*, 60, 504–526, doi:10.1016/j.atmosenv.2012.06.039, 2012.
- Kenyon, K. W., & Kridler, E. (1969). Laysan albatrosses swallow indigestible matter. *The Auk*, 86: 339–343.
- Khalid, Amina, et al. "Are bio-based and biodegradable microplastics impacting for blue mussel (*Mytilus edulis*)?" *Marine Pollution Bulletin* 167 (2021): 112295.
- Khuyen, V. T. K., Le, D. V., Anh, L. H., Fischer, A. R., & Dornack, C. (2021). Investigating the Correlation of Microplastic Pollution Between Seawater and Marine Salt Using Micro-Raman Spectroscopy. *Frontiers in Marine Science*, 8.
- Kim, S. K., & Song, N. S. (2021). Microplastics in edible salt: a literature review focusing on uncertainty related with measured minimum cutoff sizes. *Current Opinion in Food Science*, 41, 16-25.
- Klein S, Worch E, Knepper TP (2015) Occurrence and spatial distribution of microplastics in river shore sediments of the Rhine-Main area in Germany. *Environ Sci Technol* 19: 6070-6076
- Klein, M., Fischer, E.K., 2019. Microplastic abundance in atmospheric deposition within the Metropolitan area of Hamburg, Germany. *Sci. Total Environ.* 685, 96–103.
- Kloss, L., Meyer, J. D., Graeve, L., & Vetter, W. (2015). Sodium intake and its reduction by food reformulation in the European Union—A review. *NFS journal*, 1, 9-19.
- Koch, H. M., Bolt, H. M., Preuss, R., Angerer, J., New metabolites of di(2-ethylhexyl)phthalate (DEHP) in human urine and serum after single oral doses of deuterium-labelled DEHP, *Arch. Toxicol.* 2005, 79, 367–376.
- Koch, H.M.; Ruther, M.; Schutze, A.; Conrad, A.; Palmke, C.; Apel, P.; Bruning, T.; Kolossa-Gehring, M. Phthalate metabolites in 24-h urine samples of the German Environmental Specimen Bank (ESB) from 1988 to 2015 and a comparison with US NHANES data from 1999 to 2012. *Int. J. Hyg. Environ. Health* 2017, 220, 130–141.
- Koelmans, A. A., Bakir, A., Burton, G. A., & Janssen, C. R. (2016). Microplastic as a vector for chemicals in the aquatic environment: critical review and model-supported reinterpretation of empirical studies. *Environmental science & technology*, 50(7), 3315-3326
- Koelmans, A. A.; Besseling, E.; Foekema, E. M., Leaching of plastic additives to marine organisms. *Environmental Pollution* 2014, 187, 49-54.

Koelmans, A. A.; Besseling, E.; Wegner, A.; Foekema, E. M., Plastic as a Carrier of POPs to Aquatic Organisms: A Model Analysis. *Environmental Science & Technology* 2013, 47, (14), 7812-7820.

Koelmans, B., Pahl, S., Backhaus, T., Bessa, F., van Calster, G., Contzen, N., Kalcikova, G. (2019). A scientific perspective on microplastics in nature and society. SAPEA.

Kole, P. J., Löhr, A. J., Van Belleghem, F. G., & Ragas, A. M. (2017). Wear and tear of tyres: a stealthy source of microplastics in the environment. *International journal of environmental research and public health*, 14(10), 1265.

Kosuth, M., Mason, S. A., & Wattenberg, E. V. (2018). Anthropogenic contamination of tap water, beer, and sea salt. *PloS one*, 13(4), e0194970.

Kosuth, M., Mason, S. A., & Wattenberg, E. V. (2018). Anthropogenic contamination of tap water, beer, and sea salt. *PloS one*, 13(4), e0194970.

Krauskopf, L. G. (September 1993). "Plasticizer structure/performance relationships". *Journal of Vinyl and Additive Technology*. 15 (3): 140–147. doi:10.1002/vnl.730150306.

Kreider, M.L.; Panko, J.M.; McAtee, B.L.; Sweet, L.I.; Finley, B.L. Physical and chemical characterization of tire-related particles: Comparison of particles generated using different methodologies. *Sci. Total Environ.* 2010, 408, 652–659

Lambert, S., Scherer, C., & Wagner, M. (2017). Ecotoxicity testing of microplastics: Considering the heterogeneity of physicochemical properties. *Integrated environmental assessment and management*, 13: 470–475.

Lebreton, L. C., Van der Zwet, J., Damsteeg, J. W., Slat, B., Andrady, A., & Reisser, J. (2017)

Lechner A, Keckeis H, Lumesberger-Loisl F, Zens B, Krusch R, Tritthart M, Schludermann E(2014) The Danube so colourful: a potpourri of plastic litter outnumbers fish larvae in Europe's second largest river. *Environ Pollut* 188: 177-181

Lee, H. J., Song, N. S., Kim, J. S., & Kim, S. K. (2021). Variation and uncertainty of microplastics in commercial table salts: critical review and validation. *Journal of hazardous materials*, 402, 123743.

Lee, S., Song, G. J., Kannan, K., & Moon, H. B. (2014). Occurrence of PBDEs and other alternative brominated flame retardants in sludge from wastewater treatment plants in Korea. *Science of the total environment*, 470, 1422-1429.

Lei, L., Wu, S., Lu, S., Liu, M., Song, Y., Fu, Z., He, D. (2018b). Microplastic particles cause intestinal damage and other adverse effects in zebrafish *Danio rerio* and nematode *Caenorhabditis elegans*. *Science of the Total Environment*, 619, 1-8.

Lenz R., Kristina Enders a, Colin A. Stedmon a David M.A. Mackenzie , Torkel Gissel Nielsen , *Marine Pollution Bulletin* 100 (2015) 82–91 A critical assessment of visual

identification of marine microplastic using Raman spectroscopy for analysis improvement
<http://dx.doi.org/10.1016/j.marpolbul.2015.09.026>

Leslie H.A., M.J. Van Velzen, S.H. Brandsma, A.D. Vethaak, J.J. Garcia-Vallejo, M.H. Lamoree Discovery and quantification of plastic particle pollution in human blood
Environ. Int., 163 (2022), Article 107199

Liebezeit, G.; Dubaish, F., Microplastics in Beaches of the East Frisian Islands Spiekeroog and Kachelplate. *Bull Environ Contam Toxicol* 2012.

Liu, C., Li, J., Zhang, Y., Wang, L., Deng, J., Gao, Y., Yu, L., Zhang, J., Sun, H., 2019. A Widespread distribution of PET and PC microplastics in dust in urban China and their estimated human exposure. *Environ. Int.* 128, 116–124.

Liu, F., Olesen, K. B., Borregaard, A. R., & Vollertsen, J. (2019). Microplastics in urban and highway stormwater retention ponds. *Science of the Total Environment*, 671, 992-1000.

Liu, F.; Nord, N.B.; Bester, K.; Vollertsen, J. Microplastics Removal from Treated Wastewater by a Biofilter. *Water* 2020, 12, 1085. <https://doi.org/10.3390/w12041085>

Liu, J. M., Li, C. Y., Zhao, N., Wang, Z. H., Lv, S. W., Liu, J. C., Wang, S. (2020). Migration regularity of phthalates in polyethylene wrap film of food packaging. *Journal of Food Science*, 85(7), 2105-2113.

Liu, K., Wang, X., Fang, T., Xu, P., Zhu, L., & Li, D. (2019) B. Source and potential risk assessment of suspended atmospheric microplastics in Shanghai. *Science of the total environment*, 675, 462-471.

Lo, H. S., Lee, Y. K., Po, B. H. K., Wong, L. C., Xu, X., Wong, C. F., Cheung, S. G. (2020). Impacts of Typhoon Mangkhut in 2018 on the deposition of marine debris and microplastics on beaches in Hong Kong. *Science of The Total Environment*, 716, 137172.

Lohmann, R. (2017). Microplastics are not important for the cycling and bioaccumulation of organic pollutants in the oceans—but should microplastics be considered POPs themselves? *Integrated environmental assessment and management*, 13: 460–465.

Lopes, C., Raimundo, J., Caetano, M., & Garrido, S. (2020). Microplastic ingestion and diet composition of planktivorous fish. *Limnology and Oceanography Letters*, 5(1), 103-112.

Lots, F. A., Behrens, P., Vijver, M. G., Horton, A. A., & Bosker, T. (2017). A large-scale investigation of microplastic contamination: abundance and characteristics of microplastics in European beach sediment. *Marine Pollution Bulletin*, 123(1-2), 219-226

Lu, Y., Zhang, Y., Deng, Y., Jiang, W., Zhao, Y., Geng, J., Ding, L., & Ren, H. (2016). Uptake and accumulation of polystyrene microplastics in zebrafish (*Danio rerio*) and toxic effects in liver. *Environmental science & technology*, 50: 4054–4060.

- Luo, Y., Gibson, C. T., Chuah, C., Tang, Y., Naidu, R., & Fang, C. (2022). Applying Raman imaging to capture and identify microplastics and nanoplastics in the garden. *Journal of Hazardous Materials*, 426, 127788.
- Maes, T., Jessop, R., Wellner, N., Haupt, K., & Mayes, A. G. (2017). A rapid-screening approach to detect and quantify microplastics based on fluorescent tagging with Nile Red. *Scientific reports*, 7(1), 1-10.
- Mani T, Hauk A, Walter U, Burkhardt-Holm P (2015) Microplastics profile along the Rhine River. *Sci Rep* 5: 1-7
- Mariska Dötsch, Johanneke Busch, Max Batenburg, Gie Liem, Erwin Tareilus, Rudi Mueller & Gert Meijer (2009) Strategies to Reduce Sodium Consumption: A Food Industry Perspective, *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 49:10, 841-851, DOI: 10.1080/10408390903044297
- Martin C Heller et al 2020 *Environ. Res. Lett.* 15 094034
- Martínez-Gómez, C., León, V. M., Calles, S., Gomáriz-Olcina, M., & Vethaak, A. D. (2017). The adverse effects of virgin microplastics on the fertilization and larval development of sea urchins. *Mar. Environ. Res*, 130, 69-76.
- Mathalon, A., & Hill, P. (2014). Microplastic fibers in the intertidal ecosystem surrounding Halifax Harbor, Nova Scotia. *Marine pollution bulletin*, 81: 69–79.
- Mato, Y., Isobe, T., Takada, H., Kanehiro, H., Ohtake, C., Kaminuma, T., 2001. "Plastic resin pellets as a transport medium for toxic chemicals in the marine environment." *Environmental science & technology* 35 (2).
- MatWeb - Material Property Data, <https://www.matweb.com/>
- McCormick, A., Hoellein, T. J., Mason, S. A., Schlupe, J., & Kelly, J. J. (2014). Microplastic is an abundant and distinct microbial habitat in an urban river. *Environmental science & technology*, 48(20), 11863-11871.
- Meeker, John D., Sheela Sathyanarayana, and Shanna H. Swan. "Phthalates and other additives in plastics: human exposure and associated health outcomes." *Philosophical transactions of the royal society B: biological sciences* 364.1526 (2009): 2097-2113.
- Miao, L., Wang, P., Hou, J., Yao, Y., Liu, Z., Liu, S., & Li, T. (2019). Distinct community structure and microbial functions of biofilms colonizing microplastics. *Science of the Total Environment*, 650, 2395-2402.
- Microbead-Free Waters Act of 2015 (2015). Public Law No. 114-114. 129 Stat. 3129.
- Pedá, C., Caccamo, L., Fossi, M. C., Andaloro, F., Genovese, L., Perdichizzi, A., et al. (2016). Intestinal alterations in European sea bass *Dicentrarchus labrax* (Linnaeus, 1758) exposed to microplastics: Preliminary results. *Environmental Pollution*, 212, 251–256.

- Milani, M.; Pucillo, F.P.; Ballerini, M.; Camatini, M.; Gualtieri, M.; Martino, S. First evidence of tyre debris characterization at the nanoscale by focused ion beam. *Mater. Charact.* 2004, 52, 283–288.
- Mintenig, S. M., Kooi, M., Erich, M. W., Primpke, S., Redondo-Hasselerharm, P. E., Dekker, S. C., Van Wezel, A. P. (2020). A systems approach to understand microplastic occurrence and variability in Dutch riverine surface waters. *Water research*, 176, 115723.
- Morritt D, Stefanoudis PV, Pearce D, Crimmen OA, Clark PF (2014) Plastic in the Thames: a river runs through it. *Mar Pollut Bull* 78:196-200
- Mrosovsky, N.; Ryan, G. D.; James, M. C., Leatherback turtles: The menace of plastic. *Mar Pollut Bull* 2009, 58, (2), 287-289
- MSFD Joint Research Centre Institute for Environment and Sustainability, 2013 Guidance on Monitoring of Marine Litter in European Seas, ISSN 1018-5593, doi:10.2788/99475
- Murakami S., M. Oguchi, T. Tasaki, I. Daigo, S. Hashimoto, Lifespan of commodities, part I: The creation of a database and its review. *J. Ind. Ecol.* 14, 598–612 (2010).
- Murphy F, Ewins C, Carbonnier F, Quinn B (2016) Wastewater treatment works as a source of microplastics in the aquatic environment. *Environ Sci Technol* 50: 5800-5808
- Napper, I. E., & Thompson, R. C. (2020). Plastic debris in the marine environment: history and future challenges. *Global Challenges*, 4: 1900081
- Narmadha, V. V., Jose, J., Patil, S., Farooqui, M., Srimuruganandam, B., Saravanadevi, S., & Krishnamurthi, K. (2020). Assessment of microplastics in roadside suspended dust from urban and rural environment of Nagpur, India. *International Journal of Environmental Research*, 14(6), 629-640.
- Nayar, Kishor G.; Sharqawy, Mostafa H.; Banchik, Leonardo D.; Lienhard V, John H. (July 2016). "Thermophysical properties of seawater: A review and new correlations that include pressure dependence". *Desalination*. 390: 1–24. doi:10.1016/j.desal.2016.02.024
- Neves, D., Sobral, P., Ferreira, J. L., & Pereira, T. (2015). Ingestion of microplastics by commercial fish off the Portuguese coast. *Marine pollution bulletin*, 101(1), 119-126.
- Nielsen, T. D., Hasselbalch, J., Holmberg, K., & Stripple, J. (2020). Politics and the plastic crisis: A review throughout the plastic life cycle. *Wiley Interdisciplinary Reviews: Energy and Environment*, 9: e360
- NOAA Marine Debris Program National Oceanic and Atmospheric Administration, U.S. Department of Commerce Technical Memorandum, NOS-OR&R-48, 2015, Laboratory Methods for the Analysis of Microplastics in the Marine Environment: Recommendations for quantifying synthetic particles in waters and sediments
- Nuelle MT, Dekiff JH, Remy D, Fries E (2014) A new analytical approach for monitoring microplastics in marine sediments. *Environ Pollut* 184:161-169

- Ohlson, C. G., & Hardell, L. (2000). Testicular cancer and occupational exposures with a focus on xenoestrogens in polyvinyl chloride plastics. *Chemosphere*, 40(9-11), 1277-1282.
- Oktavilia Shanty , Mita Hapsari , Firmansyah , Andryan Setyadharma , Indah Fajarini Sri Wahyuningsum Plastic Industry and World Environmental Problems E3S Web of Conferences 202, 05020 (2020) <https://doi.org/10.1051/e3sconf/202020205020>
- ONU, 2015 <https://unric.org/it/wp-content/uploads/sites/3/2019/11/Agenda-2030-Onu-italia.pdf>
- Ormsby, R. T., Cantley, M., Kogawa, M., Solomon, L. B., Haynes, D. R., Findlay, D. M., & Atkins, G. J. (2016). Evidence that osteocyte perilacunar remodelling contributes to polyethylene wear particle induced osteolysis. *Acta Biomaterialia*, 33, 242-251.
- Pellini, G., Gomiero, A., Fortibuoni, T., Ferrà, C., Grati, F., Tasseti, A. N., Polidori, P., Fabi, G., & Scarcella, G. (2018). Characterization of microplastic litter in the gastrointestinal tract of *Solea solea* from the Adriatic Sea. *Environmental pollution*, 234, 943-952.
- Peñalver, R., Arroyo-Manzanares, N., López-García, I., & Hernández-Córdoba, M. (2020). An overview of microplastics characterization by thermal analysis. *Chemosphere*, 242, 125170.
- Plastics - the Facts (2021) An analysis of European plastics production, demand and waste data <https://plasticseurope.org/wp-content/uploads/2021/12/Plastics-the-Facts-2021-web-final.pdf>
- Plastics Additives and Testing, 2013, Muralisrinivasan Natamai Subramanian, John Wiley & Sons Inc, ISBN:9781118118900
- Plastics Additives Handbook, 6E 6th Edition, Hans Zweifel, 2009, ISBN-10:1569904308
- PlasticsEurope, Plastics - The Facts 2014/2015: An analysis of European plastics production, demand and waste date. Association of Plastic Manufacturers 2015.
- Pleil, J. D., Wallace, M. A. G., Davis, M. D., & Matty, C. M. (2021). The physics of human breathing: flow, timing, volume, and pressure parameters for normal, on-demand, and ventilator respiration. *Journal of Breath Research*, 15(4), 042002.
- Powles J., S. Fahimi, R. Micha, S. Khatibzadeh, P. Shi, M. Ezzati, R.E. Engell, S.S. Lim, G. Danaei, D. Mozaffarian Global, regional and national sodium intakes in 1990 and 2010: a systematic analysis of 24 h urinary sodium excretion and dietary surveys worldwide *BMJ Open*, 3 (2013)
- Prata, J. C., da Costa, J. P., Lopes, I., Duarte, A. C., & Rocha-Santos, T. (2020). Environmental exposure to microplastics: An overview on possible human health effects. *Science of the Total Environment*, 702, 134455.

- Primpke, S., Lorenz, C., Rascher-Friesenhausen, R., & Gerdts, G. (2017). An automated approach for microplastics analysis using focal plane array (FPA) FTIR microscopy and image analysis. *Analytical Methods*, 9(9), 1499-1511.
- Qiu, Q, Tan Z, Wang J, Peng J, Li M, Zhan Z (2016) Extraction, enumeration and identification methods for monitoring microplastics in the environment. *Estuar Coast Shelf S* 176:102-109
- Quinn, Brian, Fionn Murphy, and Ciaran Ewins. "Validation of density separation for the rapid recovery of microplastics from sediment." *Analytical Methods* 9.9 (2017): 1491-1498.
- Ragusa A., V. Notarstefano, A. Svelato, A. Belloni, G. Gioacchini, C. Blondeel, E. Zucchelli, C. De Luca, S. D'Avino, A. Gulotta, O. Carnevali Raman microspectroscopy detection and characterisation of microplastics in human breastmilk *Polymers*, 14 (13) (2022), p. 2700
- Ragusa, A., Svelato, A., Santacroce, C., Catalano, P., Notarstefano, V., Carnevali, O., ... & Giorgini, E. (2021). Plasticenta: First evidence of microplastics in human placenta. *Environment International*, 146, 106274.
- Rainieri, S., & Barranco, A. (2019). Microplastics, a food safety issue?. *Trends in food science & technology*, 84, 55-57.
- Ramos, M. G., Heffernan, A. L., Toms, L. M. L., Calafat, A. M., Ye, X., Hobson, P., Mueller, J. F. (2016). Concentrations of phthalates and DINCH metabolites in pooled urine from Queensland, Australia. *Environment international*, 88, 179-186.
- Rasmussen, L. A., Iordachescu, L., Tumlin, S., & Vollertsen, J. (2021). A complete mass balance for plastics in a wastewater treatment plant-Macroplastics contributes more than microplastics. *Water Research*, 201, 117307.
- Rathnayaka, D. D. T., Vidanage, P. W., Wasalathilake, K. C., Wickramasingha, H. W., Wijayarathne, U. P. L., & Perera, S. A. S. (2013). Development of a process to manufacture high quality refined salt from crude solar salt. *International Scholarly and Scientific Research & Innovation*, 7(12), 17-22.,
- Rech S, Macaya-Caquilpán V, Pantoja JF, Rivadeneira MM, Madariaga DJ, Thiel M (2014) Rivers as a source of marine litter—A study from the SE Pacific. *Mar Pollut Bull* 82:66-75
- Renner, G., Nellessen, A., Schwiers, A., Wenzel, M., Schmidt, T. C., & Schram, J. (2019). Data preprocessing & evaluation used in the microplastics identification process: a critical review & practical guide. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 111, 229-238.
- Renzi, M., Guerranti, C., & Blašković, A. (2018). Microplastic contents from maricultured and natural mussels. *Marine pollution bulletin*, 131, 248-251.
- Renzi, M., Specchiulli, A., Blašković, A., Manzo, C., Mancinelli, G., & Cilenti, L. (2019). Marine litter in stomach content of small pelagic fishes from the Adriatic Sea: sardines

(*Sardina pilchardus*) and anchovies (*Engraulis encrasicolus*). *Environmental Science and Pollution Research*, 26(3), 2771-2781

Report EUR 26113 JRC SCIENTIFIC AND POLICY REPORTS EN Guidance on Monitoring of Marine Litter in European Seas MSFD Technical Subgroup on Marine Litter 2013 MSFD-TSML (Technical Subgroup on Marine Litter), (2013). Guidance on Monitoring of Marine Litter in European Seas.

<https://mcc.jrc.ec.europa.eu/documents/201702074014.pdf>

Revel, M., Châtel, A., & Mouneyrac, C. (2018). Micro (nano) plastics: A threat to human health?. *Current Opinion in Environmental Science & Health*, 1, 17-23.

Rios Mendoza LM, Evans CY (2013) Plastics are invading not only the ocean but also the Great Lakes. In: Abstracts of Papers of the American Chemical Society Vol. 245

Rios, L. M., Moore, C., & Jones, P. R. (2007). Persistent organic pollutants carried by synthetic polymers in the ocean environment. *Marine pollution bulletin*, 54(8), 1230-1237.

Rist, S., Vianello, A., Winding, M. H. S., Nielsen, T. G., Almeda, R., Torres, R. R., & Vollertsen, J. (2020). Quantification of plankton-sized microplastics in a productive coastal Arctic marine ecosystem. *Environmental Pollution*, 266, 115248.

Rocha, B.A.; Asimakopoulos, A.G.; Barbosa, F., Jr.; Kannan, K. Urinary concentrations of 25 phthalatemetabolites in Brazilian children and their association with oxidative DNA damage. *Sci. Total Environ.* 2017,586, 152–162.

Rocha-Santos, T., & Duarte, A. C. (2015). A critical overview of the analytical approaches to the occurrence, the fate and the behavior of microplastics in the environment. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 65, 47-53.

Rochman C. M., Hentschel B. T. & Teh S. J. (2014). Long-term sorption of metals is similar among plastic types: implications for plastic debris in aquatic environments. *PLoS ONE*, 9, e85433.

Rochman, C. M.; Hoh, E.; Kurobe, T.; Teh, S. J., Ingested plastic transfers hazardous chemicals to fish and induces hepatic stress. *Sci. Rep.* 2013, 3.

Romeo, T., Pietro, B., Pedà, C., Consoli, P., Andaloro, F., & Fossi, M. C. (2015). First evidence of presence of plastic debris in stomach of large pelagic fish in the Mediterranean Sea. *Marine pollution bulletin*, 95(1), 358-361.

Ryan, P. G.; Moore, C. J.; Van Franeker, J. A.; Moloney, C. L. (2009). "Monitoring the abundance of plastic debris in the marine environment". *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*. 364 (1526): 1999–2012.
doi:10.1098/rstb.2008.0207

Sabaredzovic, A., Sakhi, A. K., Brantsæter, A. L., & Thomsen, C. (2015). Determination of 12 urinary phthalate metabolites in Norwegian pregnant women by core-shell high performance liquid chromatography with on-line solid-phase extraction, column switching and tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography B*, 1002, 343-352.

- Sadri SS, Thompson RC (2014) On the quantity and composition of floating plastic debris entering and leaving the Tamar Estuary, Southwest England. *Mar Pollut Bull* 81:55-60
- Sajiki, J.; Yonekubo, J., Leaching of bisphenol A (BPA) to seawater from polycarbonate plastic and its degradation by reactive oxygen species. *Chemosphere* 2003, 51, (1), 55-62.
- Sang, W., Chen, Z., Mei, L., Hao, S., Zhan, C., bin Zhang, W., Liu, J. (2021). The abundance and characteristics of microplastics in rainwater pipelines in Wuhan, China. *Science of the Total Environment*, 755, 142606.
- Sathish, M. N., Jeyasanta, I., & Patterson, J. (2020). Microplastics in salt of Tuticorin, southeast coast of India. *Archives of environmental contamination and toxicology*, 79(1), 111-121.
- Savoca, D., Arculeo, M., Barreca, S., Buscemi, S., Caracappa, S., Gentile, A., Pace, A. (2018). Chasing phthalates in tissues of marine turtles from the Mediterranean sea. *Marine pollution bulletin*, 127, 165-169.
- Schirinzi, G. F., Pérez-Pomeda, I., Sanchís, J., Rossini, C., Farré, M., & Barceló, D. (2017). Cytotoxicity effects of commonly used nanomaterials and microplastics on cerebral and epithelial human cells. *Environ. Res.* 159, 579–587.
- Schirinzi, Gabriella F., et al. "Trace analysis of polystyrene microplastics in natural waters." *Chemosphere* 236 (2019): 124321.
- Schymanski, D., Goldbeck, C., Humpf, H. U., & Fürst, P. (2018). Analysis of microplastics in water by micro-Raman spectroscopy: release of plastic particles from different packaging into mineral water. *Water research*, 129, 154-162.
- Siddique, R., Khatib, J., & Kaur, I. (2008). Use of recycled plastic in concrete: A review. *Waste management*, 28(10), 1835-1852.
- Silva, M. J., Barr, D. B., Reidy, J. A., Kato, K., et al., Glucuronidation patterns of common urinary and serum monoesterphthalate metabolites, *Arch. Toxicol.* 2003, 77, 561–567.
- Simon, M., van Alst, N., & Vollertsen, J. (2018). Quantification of microplastic mass and removal rates at wastewater treatment plants applying Focal Plane Array (FPA)-based Fourier Transform Infrared (FT-IR) imaging. *Water research*, 142, 1-9.
- Sjödin, A., Hagmar, L., Klasson-Wehler, E., Kronholm-Diab, K., Jakobsson, E., & Bergman, A. (1999). Flame retardant exposure: polybrominated diphenyl ethers in blood from Swedish workers. *Environmental Health Perspectives*, 107(8), 643-648.
- Sobhani, Z., Lei, Y., Tang, Y., Wu, L., Zhang, X., Naidu, R., Fang, C. (2020). Microplastics generated when opening plastic packaging. *Scientific reports*, 10(1), 1-7.
- Song, Y. K., Hong, S. H., Eo, S., Han, G. M., & Shim, W. J. (2020). Rapid production of micro-and nanoplastics by fragmentation of expanded polystyrene exposed to sunlight. *Environmental Science & Technology*, 54(18), 11191-11200.

Sridharan, S., Kumar, M., Singh, L., Bolan, N. S., & Saha, M. (2021). Microplastics as an emerging source of particulate air pollution: A critical review. *Journal of Hazardous Materials*, 418, 126245.

Stock, F., Kochleus, C., Bansch-Baltruschat, B., Brennholt, N., & Reifferscheid, G. (2019). Sampling techniques and preparation methods for microplastic analyses in the aquatic environment—A review. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 113, 84-92.

Storck FR, Karlsruhe TZW, Kools, SA (2015) Microplastics in Fresh Water Resources Carr S, Liu J, Tesoro AG (2016) Transport and fate of microplastic particles in wastewater treatment plants. *Water Res* 91:174-182

Strong AB (2000) *Plastics: Materials and Processing* (2nd ed). Prentice Hall, London.

Suaria, G., Perold, V., Lee, J. R., Lebouard, F., Aliani, S., & Ryan, P. G. (2020). Floating macro-and microplastics around the Southern Ocean: Results from the Antarctic Circumnavigation Expedition. *Environment international*, 136: 105494.

Syakti, Agung Dhamar. "Microplastics monitoring in marine environment." *Omni-Akuatika* 13.2 (2017).

Tagg AS, Sapp M, Harrison JP, Ojeda JJ (2015) Identification and quantification of microplastics in wastewater using FPA-based reflectance micro-FT-IR imaging. *Anal Chem* 87: 6032-6040

Tagg, A. S., Harrison, J. P., Ju-Nam, Y., Sapp, M., Bradley, E. L., Sinclair, C. J., & Ojeda, J. J. (2017). Fenton's reagent for the rapid and efficient isolation of microplastics from wastewater. *Chemical Communications*, 53(2), 372-375.

Teuten, E. L., Rowland, S. J., Galloway, T. S., & Thompson, R. C. (2007). Potential for plastics to transport hydrophobic contaminants. *Environmental science & technology*, 41(22), 7759-7764.

Thinh, T. Q., Sang, T. T. N., Viet, T. Q., Dan, N. P., Strady, E., & Chung, K. L. T. (2020). Preliminary assessment on the microplastic contamination in the atmospheric fallout in the Phuoc Hiep landfill, Cu Chi, Ho Chi Minh city. *Vietnam Journal of Science, Technology and Engineering*, 62(3), 83-89.

Thiounn Timmy, Rhett C. Smith 2020 Advances and approaches for chemical recycling of plastic waste <https://doi.org/10.1002/pol.20190261>

Thomas, Daniela, et al. "Sample preparation techniques for the analysis of microplastics in soil—a review." *Sustainability* 12.21 (2020): 9074.

Thompson RC, Olsen Y, Mitchell RP, Davis A, Rowland SJ, John AWG, McGonigle D, Russell AE (2004) Lost at sea: where is all the plastic? *Science* 304:838

Torre, M., Digka, N., Anastasopoulou, A., Tsangaris, C., & Mytilineou, C (2016). Anthropogenic microfibrils pollution in marine biota. A new and simple methodology to minimize airborne contamination. *Mar. Pollut. Bull.* 113 (1), 55–61.

- Tranfo, G., Papaleo, B., Caporossi, L., Capanna, S., De Rosa, M., Pigini, D., Paci, E. (2013). Urinary metabolite concentrations of phthalate metabolites in Central Italy healthy volunteers determined by a validated HPLC/MS/MS analytical method. *International journal of hygiene and environmental health*, 216(4), 481-485.
- Tu, C., Zhou, Q., Zhang, C., Liu, Y., & Luo, Y. (2020) Biofilms of Microplastics. In: He D., Luo Y. (eds) *Microplastics in Terrestrial Environments. The Handbook of Environmental Chemistry*, vol 95. Springer, Cham
- U.S. Environmental Protection Agency (EPA), *Municipal Solid Waste Generation, Recycling, and Disposal in the United States: Tables and Figures for 2012* (EPA, 2014).
- U.S. Geological Survey, *Mineral Commodity Summaries, January 2021, Salt*
<https://pubs.usgs.gov/periodicals/mcs2021/mcs2021-salt.pdf>
- Valavanidis, A., Vlachogianni, T., Fiotakis, K., & Loridas, S. (2013). Pulmonary oxidative stress, inflammation and cancer: respirable particulate matter, fibrous dusts and ozone as major causes of lung carcinogenesis through reactive oxygen species mechanisms. *International journal of environmental research and public health*, 10(9), 3886-3907.
- Van Cauwenberghe, L., & Janssen, C. R. (2014). Microplastics in bivalves cultured for human consumption. *Environmental pollution*, 193, 65-70
- Van Cauwenberghe, L., Vanreusel, A., Mees, J., & Janssen, C. R. (2013). Microplastic pollution in deep-sea sediments. *Environmental pollution*, 182, 495-499.
- Vandermeersch, G., Van Cauwenberghe, L., Janssen, C. R., Marques, A., Granby, K., Fait, G., ... & Devriese, L. (2015). A critical view on microplastic quantification in aquatic organisms. *Environmental Research*, 143, 46-55.
- Verschoor A.J. Towards a definition of microplastics Considerations for the specification of physico-chemical properties RIVM Letter report 2015-0116 National Institute for Public Health and the Environment The Netherlands www.rivm.nl
- Vert, Michel (2012). "Terminology for biorelated polymers and applications (IUPAC Recommendations 2012)" (PDF). *Pure and Applied Chemistry*. 84 (2): 377–410. doi:10.1351/PAC-REC-10-12-04
- Vianello A, Boldrin A, Guerriero P, Moschino V, Rella R, Sturaro A, Da Ros L (2013) Microplastic particles in sediments of Lagoon of Venice, Italy: first observations on occurrence, spatial patterns and identification. *Estuar Coast Shelf Sci* 130:54-61
- Vianello, A., Jensen, R. L., Liu, L., & Vollertsen, J. (2019). Simulating human exposure to indoor airborne microplastics using a Breathing Thermal Manikin. *Scientific reports*, 9(1), 1-11.
- Von Moos, N.; Burkhardt-Holm, P.; Köhler, A., Uptake and Effects of Microplastics on Cells and Tissue of the Blue Mussel *Mytilus edulis* L. after an Experimental Exposure. *Environmental Science & Technology* 2012, 46, (20), 11327-11335.

- Wagner M, Scherer C, Alvarez-Muñoz D, Brennholt N, Bourrain X, Buchinger S, Reifferscheid G (2014) Microplastics in freshwater ecosystems: what we know and what we need to know. *Environ Sci Eur* 26:1-9
- Walker, Tony R. (August 2021). "(Micro)plastics and the UN Sustainable Development Goals". *Current Opinion in Green and Sustainable Chemistry*. 30: 100497. doi:10.1016/j.cogsc.2021.100497.
- Wang, J., Tan, Z., Peng, J., Qiu, Q., & Li, M. (2016). The behaviors of microplastics in the marine environment. *Marine Environmental Research*, 113, 7-17.
- Wang, L., Zhang, J., Hou, S., & Sun, H. (2017). A simple method for quantifying polycarbonate and polyethylene terephthalate microplastics in environmental samples by liquid chromatography–tandem mass spectrometry. *Environmental Science & Technology Letters*, 4(12), 530-534.
- Wang, Y., Zhu, H., & Kannan, K. (2019). A review of biomonitoring of phthalate exposures. *Toxics*, 7(2), 21.
- Warren, John K. "Solution mining and salt cavern usage." *Evaporites*. Springer, Cham, 2016. 1303-1374.
- Waters, C. N., Zalasiewicz, J., Summerhayes, C., Barnosky, A. D., Poirier, C., Gałuszka, A., Cearreta, A., Edgeworth, M., Ellis, E. C., Ellis, M., Jeandel, C., Leinfelder, R., McNeill, J. R., Richter, D. deB., Steffen, W., Syvitski, J., Vidas, D., Wagreich, M., Williams, M., Zhisheng, A., Grinevald, J., Odada, E., Oreskes, N., & Wolfe, A. P. (2016). The Anthropocene is functionally and stratigraphically distinct from the Holocene. *Science*, 351: 137.
- Watts, A. J.; Lewis, C.; Goodhead, R. M.; Beckett, S. J.; Moger, J.; Tyler, C. R.; Galloway, T. S., Uptake and retention of microplastics by the shore crab *Carcinus maenas*. *Environ. Sci. Technol.* 2014, 48, (15), 8823-30.
- Webster J.L., E.K. Dunford, B.C. Neal A systematic survey of the sodium contents of processed foods *Am. J. Clin. Nutr.*, 91 (2010), pp. 413-420
- Welden, N. A., Abylkhani, B., & Howarth, L. M. (2018). The effects of trophic transfer and environmental factors on microplastic uptake by plaice, *Pleuronectes platessa*, and spider crab, *Maja squinado*. *Environmental Pollution*, 239, 351-358.
- Welden, N.A.C., & Cowie, P.R. (2016). Long-term microplastic retention causes reduced body condition in the langoustine, *Nephrops norvegicus*. *Environ. Pollut.* 218, 895–900.
- Wesch C, Elert AM, Worner M, Braun U, Klein R, Paulus M (2017) Assuring quality in microplastic monitoring: About the value of clean-air devices as essentials for verified data. *Sci Reports* 7
- Wesch, C., Bredimus, K., Paulus, M., & Klein, R. (2016). Towards the suitable monitoring of ingestion of microplastics by marine biota: A review. *Environmental Pollution*, 218, 1200-1208

- West-Eberhard, Mary Jane. "Nutrition, the visceral immune system, and the evolutionary origins of pathogenic obesity." *Proceedings of the National Academy of Sciences* 116.3 (2019): 723-731.
- World Health Organization. (2007). Reducing salt intake in populations: report of a WHO forum and technical meeting, 5-7 October 2006, Paris, France.
- Wright, S. L., Rowe, D., Thompson, R. C., & Galloway, T. S. (2013). Microplastic ingestion decreases energy reserves in marine worms. *Current Biology*, 23: R1031–R1033.
- Wright, S. L., Ulke, J., Font, A., Chan, K. L. A., & Kelly, F. J. (2020). Atmospheric microplastic deposition in an urban environment and an evaluation of transport. *Environment international*, 136, 105411.
- Wright, Stephanie L., and Frank J. Kelly. "Plastic and human health: a micro issue?" *Environmental science & technology* 51.12 (2017): 6634-6647.
- Wurl, Oliver, and Jeffrey Phillip Obbard. "A review of pollutants in the sea-surface microlayer (SML): a unique habitat for marine organisms." *Marine pollution bulletin* 48.11-12 (2004): 1016-1030.
- Xu, J. L., Thomas, K. V., Luo, Z., & Gowen, A. A. (2019). FTIR and Raman imaging for microplastics analysis: State of the art, challenges and prospects. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 119, 115629.
- Yang, D., Shi, H., Li, L., Li, J., Jabeen, K., & Kolandhasamy, P. (2015). Microplastic pollution in table salts from China. *Environmental science & technology*, 49(22), 13622-13627.
- Ye, X.; Pierik, F.H.; Angerer, J.; Meltzer, H.M.; Jaddoe, V.W.V.; Tiemeier, H.; Hoppin, J.A.; Longnecker, M.P. Levels of metabolites of organophosphate pesticides, phthalates, and bisphenol A in pooled urine specimens from pregnant women participating in the Norwegian Mother and Child Cohort Study (MoBa). *Int. J. Hyg. Environ. Health* 2009, 212, 481–491.
- Yeager, A. (2015). Table salt and shellfish can contain plastic. *Science News for Students*.
- Yoshida, S., Hiraga, K., Takehana, T., Taniguchi, I., Yamaji, H., Maeda, Y., Oda, K. (2016). A bacterium that degrades and assimilates poly (ethylene terephthalate). *Science*, 351(6278), 1196-1199. Gerritse, J., Leslie, H.A., de Tender, C.A. et al. Fragmentation of plastic objects in a laboratory seawater microcosm. *Sci Rep* 10, 10945 (2020). <https://doi.org/10.1038/s41598-020-67927-1>
- Yuedong Chen Zhaojie Cui Xiaowei Cuib Wei Liua Xinlei Wanga Xin Xin Li Shouxiu Li Resources, Conservation and Recycling 146, 348-357, 2019, Life cycle assessment of end-of-life treatments of waste plastics in Chin
- Zbyszewski, Maciej, and Patricia L. Corcoran. "Distribution and degradation of fresh water plastic particles along the beaches of Lake Huron, Canada." *Water, Air, & Soil Pollution* 220.1 (2011): 365-372.

- Zeman, F. A., Boudet, C., Tack, K., Barneaud, A. F., Brochot, C., Pery, A. R., Vandentorren, S. (2013). Exposure assessment of phthalates in French pregnant women: results of the ELFE pilot study. *International journal of hygiene and environmental health*, 216(3), 271-279.
- Zhang, H. (2017). Transport of microplastics in coastal seas. *Estuarine, Coastal and Shelf Science*, 199, 74-86.
- Zhang, Y., Gao, T., Kang, S., & Sillanpää, M. (2019). Importance of atmospheric transport for microplastics deposited in remote areas. *Environmental Pollution*, 254, 112953. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2019.07.121>
- Zhang, Y., Kang, S., Allen, S., Allen, D., Gao, T., & Sillanpää, M. (2020). Atmospheric microplastics: A review on current status and perspectives. *Earth-Science Reviews*, 203, 103118.
- Zhang, Ying, et al. "Bio-effects of bio-based and fossil-based microplastics: Case study with lettuce-soil system." *Environmental Pollution* 306 (2022): 119395. *Pure Appl. Chem.*, Vol. 84, No. 2, pp. 377–410, 2012. <http://dx.doi.org/10.1351/PAC-REC-10-12-04>
- Zhu, L., Zhu, J., Zuo, R., Xu, Q., Qian, Y., & Lihui, A. N. (2022). Identification of microplastics in human placenta using laser direct infrared spectroscopy. *Science of The Total Environment*, 159060.
- Zobkov, M., and E. Esiukova. "Microplastics in Baltic bottom sediments: quantification procedures and first results." *Marine pollution bulletin* 114.2 (2017): 724-732.