

ALMA MATER STUDIORUM
UNIVERSITÀ DI BOLOGNA

SCUOLA DI SCIENZE

Corso di Laurea Magistrale in Analisi e Gestione dell'Ambiente

Campus di Ravenna

**METODI DI PIROLISI ANALITICA PER LA
DETERMINAZIONE DI MICROPLASTICHE DI
POLISTIRENE IN TESSUTI BIOLOGICI**

Tesi di Laurea in Analisi chimica della qualità ambientale

Relatore:

Prof. Daniele Fabbri

Presentata da:

Gabriele Luigi Bonsignore

Correlatori:

Prof. Ivano Vassura

Dott.ssa Silvia Franzellitti

IV sessione

ANNO ACCADEMICO 2016-2017

Ai miei genitori

INDICE

1. INTRODUZIONE	5
1.1. La materia plastica, da risorsa a rifiuto	
1.1.1. Origine e produzione mondiale	
1.1.2. Rifiuti plastici negli oceani	
1.2. Le microplastiche	
1.2.1. Microplastiche primarie e secondarie	
1.2.2. Da macro a micro: processi di degradazione e frammentazione	
1.2.3. Processi di trasporto di microplastiche in ambiente marino	
1.2.4. L'impatto delle microplastiche sugli ecosistemi marini	
1.3. Metodi di campionamento e pretrattamento	
1.3.1. Campionamento in acqua	
1.3.2. Campionamento nei sedimenti	
1.3.3. Campionamento nel biota	
1.4. Metodi di identificazione e quantificazione	
1.4.1. Metodo visivo	
1.4.2. Metodo di tintura	
1.4.3. Metodi strumentali	
1.4.4. Metodi termici: pirolisi analitica e termogravimetria	
1.5. Il polistirene	
2. SCOPO DELLA TESI	48
3. PARTE SPERIMENTALE	49
MATERIALI E METODI	
3.1. Materiali	
3.1.1. Solventi	
3.1.2. Polimeri standard	
3.1.3. Soluzioni standard	
3.1.4. Campioni di tessuto biologico	
3.1.5. Reagente per la digestione dei tessuti biologici	
3.1.6. Materiali per intrappolare i prodotti di pirolisi	
3.2. Strumenti e metodi per le analisi	
3.2.1. Metodo di digestione dei tessuti biologici	

3.2.2. Procedura di filtrazione ed efficienze di digestione	
3.2.3. Procedura di estrazione a riflusso del polistirene	
3.2.4. Pirolisi analitica: off – line	
3.2.5. Campionamento dei prodotti di pirolisi	
3.2.6. GC – MS	
3.2.7. Analisi qualitativa	
3.2.8. Calibrazione	
3.2.9. Recupero	
3.2.10. Bianco procedurale e analisi campioni di controllo	
3.3. Verifica della procedura di quantificazione su campioni reali	
4. RISULTATI E DISCUSSIONE	58
4.1. Valutazione del metodo di digestione dei tessuti biologici	
4.2. Pirolisi analitica off – line del polistirene	
4.2.1. Analisi qualitativa del polistirene solido	
4.2.2. Analisi qualitativa del polistirene disciolto in toluene	
4.3. Analisi quantitativa	
4.3.1. Calibrazione	
4.3.2. Calibrazione con fibra SPME	
4.3.3. Calibrazione con cartuccia SPE	
4.4. Determinazione del polistirene in campioni fortificati	
4.4.1. Analisi dei campioni fortificati con fibra SPME	
4.4.2. Analisi dei campioni fortificati con cartuccia SPE	
4.5. Determinazione del polistirene in campioni reali	
4.5.1. Ottimizzazione del metodo	
5. CONCLUSIONI	81
6. RIFERIMENTI BIBLIOGRAFICI	84

1. INTRODUZIONE

1.1. La materia plastica, da risorsa a rifiuto

Con il termine plastica si indica un'ampia classe di polimeri artificiali, derivati principalmente da petrolio greggio (circa il 10% del greggio estratto diventa plastica); ma anche da materie prime come cellulosa, carbone e gas naturale (Ivleva, N.P. et al. 2017). I polimeri, costituiti da macromolecole, hanno un'architettura molecolare caratteristica a catena lunga e quindi un peso molecolare medio molto elevato. Possono consistere in ripetizioni di unità identiche (omopolimeri) o diverse sotto-unità in varie sequenze possibili (copolimeri). Quei polimeri che si ammorbidiscono per riscaldamento, sono generalmente indicati come materiali "termoplastici". Questi includono sia pallini di resina di plastica vergine che le resine miste trattate con numerosi additivi per migliorare le prestazioni del materiale. Le proprietà uniche dei materiali plastici, come la grande facilità di lavorazione, l'economicità, la colorabilità, l'isolamento acustico, termico, elettrico, meccanico (vibrazioni), la resistenza alla corrosione e l'inerzia chimica, nonché l'idrorepellenza e l'inattaccabilità da parte di muffe, funghi e batteri ne permettono l'applicazione in una vasta gamma di settori (Fig.1.1), come packaging, edilizio, automobilistico, aeronautico, elettrico ed elettronico, agricoltura, attrezzature sportive, prodotti medici e sanitari ed abbigliamento (GESAMP, 2015; Plastics Europe, 2016).

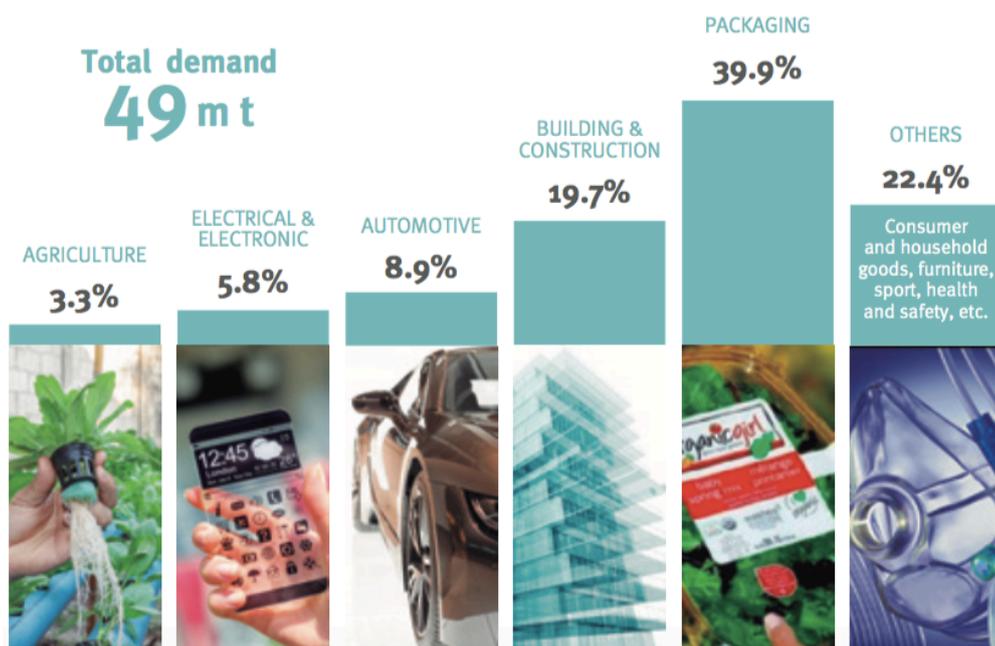


Figura 1.1: domanda europea delle materie plastiche per settore nel 2015 fonte: plastics europe 2016

Anche se i benefici sociali della plastica sono innegabili, ci sono alcune gravi preoccupazioni ambientali associate al materiale. Mentre una parte dei rifiuti di plastica è correttamente gestita, per combustione o riciclaggio, è stato stimato che più di 8 milioni di tonnellate di rifiuti di plastica all'anno finiscono in ambiente marino. Le prime osservazioni sull'inquinamento da microplastica (MP) negli ecosistemi marini furono registrate nel 1972 (Carpenter, E.J. et al., 1972). Più recentemente, è stato stimato che il 10% della plastica prodotta finisce negli oceani e comprende tra il 60% e l'80% dei rifiuti marini (Dehaut, A. et al., 2016). Dalla superficie al fondo oceanico, gli studi hanno descritto tra 7 000 e 250 000 tonnellate di plastica che galleggiano sulla superficie dell'oceano, fluttuano nella colonna d'acqua e si depositano nei sedimenti del fondo marino (Van Cauwenberghe, L. et al., 2015-a). La presenza di materiali plastici causa molteplici effetti: uccide la fauna marina, contamina la catena alimentare e persiste nell'ambiente per centinaia di anni (Galgani, F. 2015). Studi scientifici hanno dimostrato che gli additivi con cui vengono trattate le plastiche, impiegati per valorizzare le proprietà dei diversi tipi di plastica, per ammorbidirli, colorarli, renderli più processabili o più durevoli, si trasferiscono nei tessuti grassi di mitili e pesci, causando interferenze con il sistema endocrino (Balti, T. et al. 2016; Gregory, M.R. 2009). A causa delle notevoli preoccupazioni destinate dalle ingenti quantità di rifiuti plastici trovati in ambiente i leader del G7 hanno approvato un piano d'azione sui rifiuti plastici che prevede un impegno comune per condurre ulteriori ricerche con lo scopo di fornire una valutazione iniziale dello stato ecologico attuale, determinare il buono stato ecologico, stabilire una serie di obiettivi ambientali, monitorare le tendenze e le dinamiche di accumulo dei rifiuti ed infine valutare le potenziali interazioni con la vita marina (Galgani, F. et al 2013; Mahon, A. M. et al. 2014).

1.1.1. Origine e produzione mondiale

Il nome plastica deriva dal termine greco "plastikos" che significa "adatto ad essere modellato", in riferimento proprio alla grande malleabilità del materiale durante il ciclo di produzione che gli consente di essere fuso, pressato o estruso in molteplici forme, come fibre, bottiglie, scatole ecc. (Ivleva, N.P. et al. 2017). La storia della plastica comincia nel XIX° secolo quando l'Inglese Alexander Parkes, sviluppando studi sul nitrato di cellulosa, isola e brevetta nel 1862, il primo materiale plastico semisintetico, che denomina Parkesine (più nota poi come Xylonite). Il successo commerciale del nitrato di cellulosa si ebbe nel 1870 quando La Hyatt Manufacturing Company di Albany brevetta la formula della celluloide, materiale capace di sostituire il costoso e raro avorio nella produzione di palle da biliardo. Nel 1910 venne brevettata, grazie al lavoro del chimico belga Leo Baekeland, la prima materia plastica completamente sintetica, "la bachelite" prodotto di condensazione tra fenolo e formaldeide, ampiamente utilizzata nella produzione di isolanti elettrici nel settore automobilistico. Nel 1912 il chimico tedesco, Fritz Klatte, scoprì i principi che stanno alla base della produzione industriale del polivinilcloruro (PVC). Nel 1913 l'Ingegnere svizzero, Edwin Brandenberger, costruì un macchinario in grado di realizzare fogli cellulosici che commercializzò con il nome di cellophane, materiale da imballaggio trasparente e flessibile.

Negli anni '20 il chimico tedesco, Hermann Staudinger, dell'università di Friburgo, avvia gli studi sulla struttura e le proprietà dei polimeri naturali e sintetici. Egli ipotizzò che la plastica fosse costituita da enormi molecole che egli stesso chiamò "macromolecole". Staudinger fu il primo a riconoscere l'esistenza delle macromolecole, a determinare la loro struttura, a studiare le possibilità di sintesi e scoprire che esse costituiscono la maggior parte delle sostanze biologiche. Le sue ricerche, nonostante le iniziali diffidenze di molte figure autorevoli, fornirono le basi teoriche della chimica dei polimeri contribuendo allo sviluppo delle materie plastiche. Per gli oltre 30 anni dedicati agli studi dei polimeri nel 1953 gli venne assegnato il premio Nobel per la chimica, premio assegnato 10 anni più tardi anche all'Ingegnere Giulio Natta e al Chimico Karl Ziegler per "le loro scoperte nel campo della chimica e della tecnologia dei polimeri".

Gli anni '30 e la seconda guerra mondiale segnarono il definitivo passaggio verso quella che viene definita l'Era della plastica, con la creazione di una vera e propria industria moderna caratterizzata da due principali sviluppi. In primo luogo, i

produttori utilizzarono il petrolio come principale materia prima per la produzione di plastiche; il polistirene, i polimeri acrilici e il PVC furono ottenuti esclusivamente da fonti fossili. In secondo luogo, vennero migliorate le tecniche di lavorazione e di stampaggio ad iniezione. Nel 1935 Wallace Carothers della società Du pont sintetizzò per primo il Nylon (poliammide), un materiale che si diffonderà con la guerra trovando ampio spazio sul mercato grazie alle sue caratteristiche che lo rendevano assolutamente funzionale all'industria tessile.

Durante la seconda guerra mondiale, l'Europa ebbe un notevole aumento della produzione plastica poiché occorreva potenziare la capacità di produzione per sostituire i prodotti naturali non reperibili. Ne conseguì un aumento della produzione di materie plastiche ancora oggi largamente utilizzate, come il polietilene, il polistirene, i poliesteri, i polietilentereftalati e siliconi (origine e storia della plastica da: <http://www.plasticseurope.it/>). La produzione su larga scala di materie plastiche destinate al definitivo affermarsi come prezioso strumento della vita, irrompendo nel quotidiano e nell'immaginario di milioni di persone, permettendo a masse sempre più vaste di accedere a consumi prima riservati a pochi privilegiati, semplificando un'infinità di gesti quotidiani, rivoluzionando abitudini consolidate da secoli e contribuendo a creare lo "stile di vita evoluto", ebbe inizio negli anni '50. Da lì in poi la produzione aumentò rapidamente rispondendo ad una crescente domanda di manufatti e imballaggi per contenere o proteggere alimenti e merci. Ciò è stato accompagnato da una crescente diversificazione dei tipi e delle applicazioni del polimero sintetico. Molti tipi diversi di plastica sono prodotti a livello globale, ma il mercato è dominato da sei principali classi di materie plastiche: polietilene (PE), polietilentereftalato (PET), polipropilene (PP) e polivinilcloruro (PVC). Ci sono anche quantità apprezzabili di polistirene (PS, incluso EPS espanso) e poliuretano (PUR). Oltre alle principali classi di polimeri, c'è stata una proliferazione di nuovi polimeri e copolimeri per soddisfare nuove aspettative e mercati, principalmente guidati da nuove combinazioni di monomeri esistenti. Quattro regioni dominano la produzione mondiale: Cina, resto dell'Asia, Europa e Nord America (Fig. 1.2).

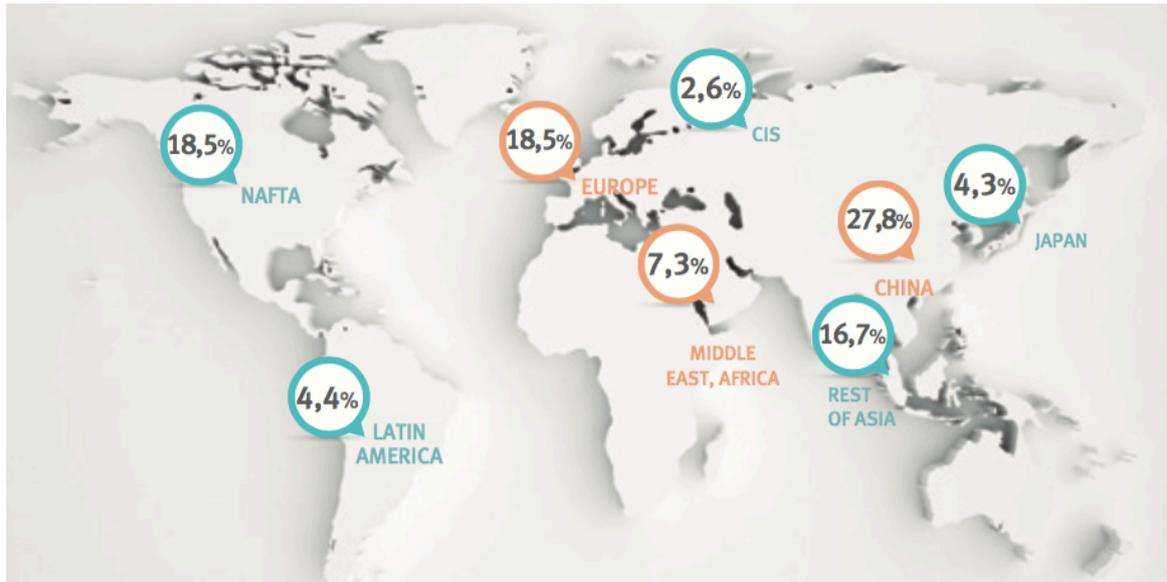


Figura 1.2: produzione mondiale di materiali plastici nel 2015 (Fonte: Plastics Europe 2016)

Da uno studio condotto nel 2016 da “Plastics-Europe” è stato stimato che nel 2011 sono stati prodotti 279 milioni di tonnellate di plastica, 288 milioni nel 2012, 299 milioni nel 2013, 311 milioni nel 2014 e 322 milioni nel 2015 (PlasticsEurope, 2015; PlasticsEurope, 2016; Ivleva, N.P. et al. 2017). Se le attuali tendenze di produzione e di utilizzo continuassero senza sosta, la produzione aumenterebbe fino a raggiungere un valore stimato di 2 miliardi di tonnellate entro il 2050 (Fig. 1.3).

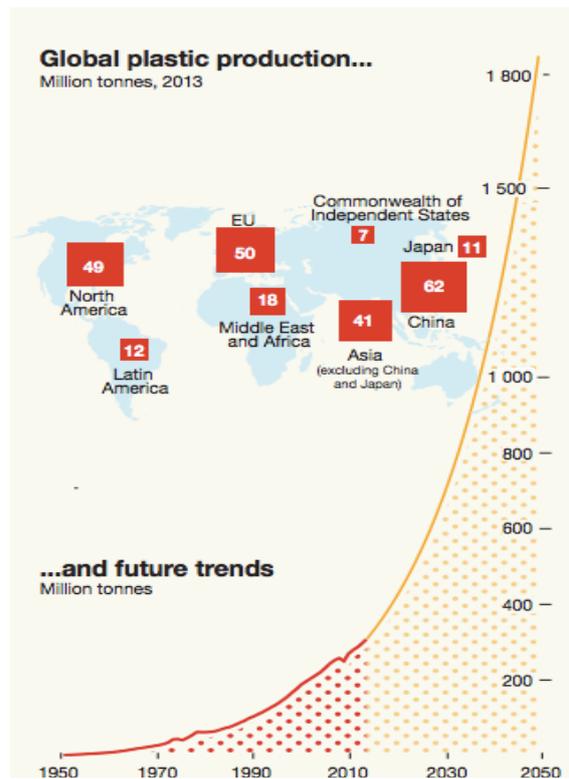


Figura 1.3: Tendenze globali della produzione di plastica, fonte: Unep and Grid-Arendal., 2016

1.1.2. Rifiuti plastici negli oceani

Il Programma delle Nazioni Unite per l'ambiente (UNEP) definisce come rifiuto marino, dall'inglese "Marine Litter", qualsiasi materiale solido antropogenico scartato, fabbricato, smaltito e abbandonato in ambiente marino o costiero. L'apporto di tali materiali può avvenire in maniera diretta tramite l'abbandono intenzionale, in mare e sulle spiagge o indirettamente attraverso fiumi, acque reflue, acque piovane e venti; oppure accidentalmente persi, compreso il materiale disperso in mare in caso di maltempo (Unep And Grid-Arendal., 2016). Qualsiasi oggetto creato dall'uomo che non subisce una naturale degradazione entro giorni o mesi può potenzialmente diventare rifiuto marino se non gestito correttamente. I rifiuti più comuni sono costituiti principalmente da carta, legno, tessuti, metallo, vetro, ceramica, gomma e plastica. Stime ufficiali affermano che tra il 60 e il 80 % dei rifiuti ritrovati sulle coste, sulla superficie del mare e sul fondale siano costituiti da uno o da una combinazione di diversi polimeri plastici (Andrady, A. L. 2015; Dehaut, A. et al., 2016). La quasi totalità di materiale plastico non è biodegradabile ma al contrario estremamente persistente. Ciò significa che la maggior parte dei polimeri prodotti oggi durerà per decenni e probabilmente per secoli. Anche i cosiddetti materiali plastici biodegradabili possono persistere a lungo in quanto la loro degradazione dipende da diversi fattori fisici, come l'esposizione solare, l'ossigeno e la temperatura. La plastica biodegradabile si decompone soprattutto attraverso la mediazione di alcuni microrganismi. Le materie plastiche etichettate come biodegradabili, progettate per subire un certo grado di degradazione in ambienti terrestri, possono persistere per lunghi periodi in condizioni marine (Unep and Grid-Arendal, 2016); ad esempio negli ambienti marini poco illuminati e freddi, l'assenza di microrganismi potrebbe prolungare il tempo di degradazione di tutte le componenti biodegradabili, aumentando la probabilità che queste plastiche vadano incontro ad altri processi chimico-fisici. La totale degradazione di un oggetto di plastica implica la completa rottura e decomposizione in acqua, anidride carbonica, metano e altre molecole. Ciò che in realtà accade per la maggior parte degli articoli in plastica, è una degradazione mediata dall'influenza degli agenti atmosferici che porta soltanto ad una frammentazione meccanica e fisica del materiale, con conseguente formazione di piccoli detriti plastici; ciò significa che il polimero stesso, in condizioni marine, potrebbe non necessariamente degradarsi

completamente in composti chimici. Un'ulteriore preoccupazione è dettata dal fatto che le plastiche possano spesso contenere molteplici tipologie di additivi, come ritardanti di fiamma (eteri difenili polibromurati) o plastificanti (ftalati, bisfenolo-A), utili per migliorare le loro caratteristiche, la sicurezza, aumentarne la trasparenza, la flessibilità, la longevità e la resistenza alla degradazione dei raggi UV. Alcune di queste sostanze, sono note per avere significativi effetti tossicologici sulle popolazioni umane e non umane attraverso l'ingestione, l'inalazione e il contatto cutaneo. Gli additivi che vengono aggiunti alla plastica durante la produzione possono essere rilasciati in ambiente nel tempo, specialmente quando la plastica inizia a deteriorarsi. Queste sostanze possono quindi essere riassorbite da altre particelle di plastica o dai lipidi ed entrare nella catena alimentare per una via secondaria. La proporzione relativa di questi additivi varia notevolmente in base al tipo di polimero e all'applicazione prevista. Inoltre, diverse sostanze utilizzate nella produzione di alcune materie plastiche hanno la tendenza a desorbire. Un esempio noto è il bisfenolo A (BPA), utilizzato nella produzione di policarbonato, ad esempio per la linea di contenitori per alimenti. Il BPA agisce come un estrogeno sintetico ed è prontamente assorbito dal corpo (Balbi, T. et al.,2016). La maggior parte della popolazione dei paesi sviluppati ha livelli rilevabili di BPA, ma i risultati ottenuti sulla gravità degli effetti sulla salute sono, ad oggi, oggetto di dibattito (Unep.,2016).

I rapporti sull'inquinamento da plastiche in oceano sono apparsi per la prima volta in letteratura scientifica nei primi anni '70, eppure oltre 40 anni dopo, non esistono stime rigorose sulla quantità e sull'origine dei detriti di plastica che ogni giorno entrano nell'ambiente marino (Jambeck, J. R.,2015). Nel 1975, il flusso annuale stimato di rifiuti di tutti i materiali verso l'oceano era di 6,4 milioni di tonnellate. Questo dato però è stato ottenuto esclusivamente da fonti marittime, come la navigazione, la pesca, il trasporto militare, le installazioni offshore (piattaforme petrolifere e impianti di acquacoltura) e non include le fonti terrestri (Gesamp.,2010). I fiumi sono importanti fonti puntuali e la stima del contributo dei sistemi fluviali potrebbe essere la chiave per quantificare gli input. Stime recenti indicano che i fiumi trasportano tra 1.15 e 2.41 milioni di tonnellate di rifiuti di plastica in mare (Lebreton et al., 2017) e questo dovrebbe aumentare nei prossimi decenni (Jambeck et al., 2015). Si ritiene che "l'origine marina" rappresenti solo il 20% del totale dei rifiuti che finiscono in oceano, mentre il più grande apporto di

materie plastiche in oceano è rappresentato dalle fonti terrestri. GESAMP (2001) nella valutazione globale dello stato dell'ambiente marino focalizzata su fonti terrestri ha riferito che "i rifiuti plastici sono maggiormente concentrati vicino alle aree urbane, sulle spiagge vicino ai villaggi e nelle rotte di navigazione, ma la loro presenza è stata rinvenuta in tutti gli oceani. La plastica è il componente più grande, seguito, nelle aree urbane, da lattine di acciaio e alluminio. I rifiuti marini sono responsabili della mortalità degli organismi marini, in particolare le tartarughe marine, i mammiferi marini e gli uccelli marini. I rifiuti marini hanno anche impatti estetici negativi, con ripercussioni sulla ricreazione e sul turismo, e possono anche rappresentare un pericolo per la navigazione. Una migliore gestione dei rifiuti solidi è la soluzione globale ai problemi dei rifiuti marini. ". Tra le principali cause di rifiuti in oceano da fonti terrestri possiamo individuare (Fig. 1.4):

- Discariche mal gestite.
- Uso del mare per attività ricreative o pesca costiera.
- Siti di produzione, lavorazione e trasporto della plastica.
- Rifiuti stradali riversati nei corsi d'acqua vicini da acque meteoriche di dilavamento.
- Trattamento delle acque reflue e scarico dei fanghi di depurazione in mare.
- Gestione e smaltimento inappropriato o illegale di rifiuti domestici e industriali.

(Gesamp.,2010).

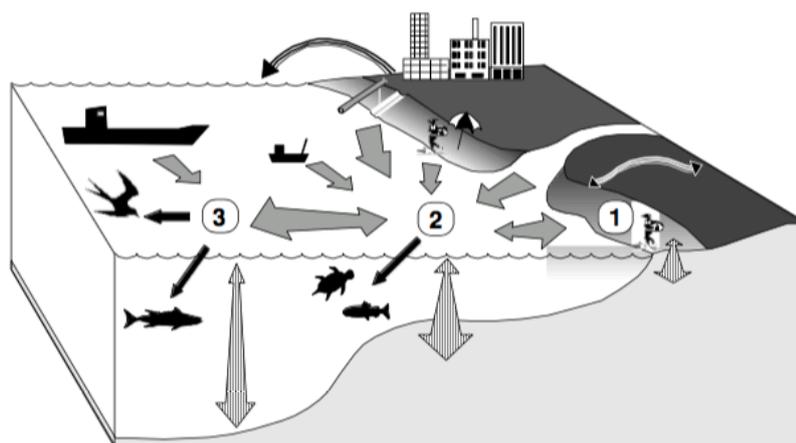


Figura 1.4: principali fonti e i percorsi della plastica nell'ambiente marino: (1) i detriti portati a riva sulle spiagge, (2) rifiuti nelle acque costiere, (3) rifiuti in mare aperto, che possono anche affondare in profondità. Fonte: Ryan et al.,2009

Uno studio condotto da Jambeck J.R. et al nel 2015, esaminando e confrontando dati di tutto il mondo sulla produzione di rifiuti solidi, densità di popolazione e stato economico, ha stimato la quantità di rifiuti plastici prodotti a terra che finisce in oceano. Nel 2010 è emerso che 192 paesi costieri, su una produzione di 275 milioni di tonnellate di rifiuti plastici, circa il 5% finiva in oceano. Le dimensioni della popolazione e soprattutto la qualità dei sistemi di gestione dei rifiuti determinano quali paesi contribuiscono in maggior misura alla produzione di rifiuti plastici mal gestiti, potenzialmente soggetti a diventare detriti marini di plastica. Nel 2010, l'83% del totale dei rifiuti mal gestiti sono stati prodotti da paesi come Cina, Indonesia, Filippine, Vietnam e Sri Lanka (Fig. 1.5). Senza miglioramenti delle infrastrutture di gestione dei rifiuti, si prevede che la quantità cumulativa di rifiuti di plastica disponibili ad entrare in oceano dalla terra aumenterà rapidamente (Jambeck et al., 2015).

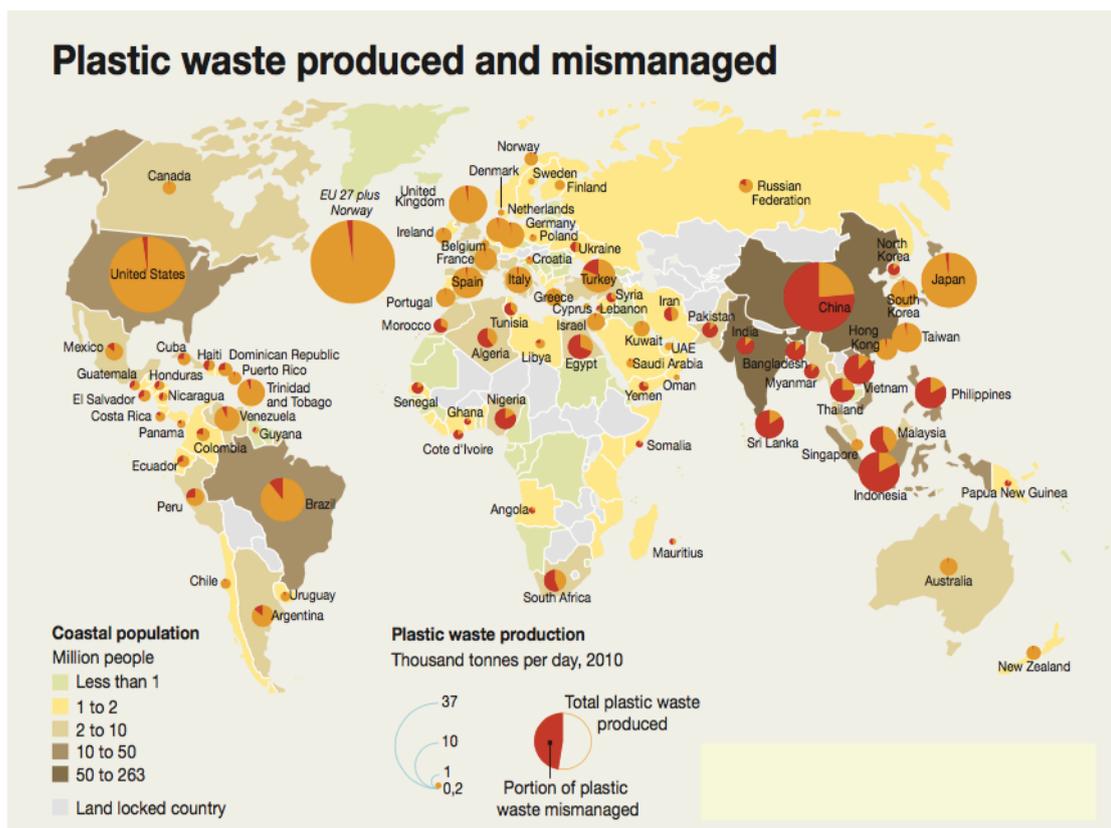


Figura 1.5: produzione mondiale e cattiva gestione di Rifiuti plastici nel 2010. Fonte: Unep and Grid-Arendal, 2016.

I rifiuti plastici presenti sono di tutte le forme e grandezze; gli oggetti di grandi dimensioni possono avere una lunghezza di alcuni metri come reti perdute e contenitori di merci persi. Oggetti di dimensioni inferiori ad un metro possono includere sacchetti di plastica, contenitori e altro. Le piccole sfere di PS espanso sono sulla scala dei millimetri. Perle di plastica di dimensioni micrometriche sono presenti in prodotti cosmetici e in stoffa sintetica o derivano da frammenti di plastica più grandi. Di recente si è registrato un notevole aumento delle preoccupazioni per le implicazioni dell'inquinamento causato da detriti di piccole dimensioni, soprattutto se costituiti da plastica. Il termine "microplastica" è stato introdotto per descrivere piccoli detriti di plastica generalmente inferiori a 5 mm di diametro. La preoccupazione per l'inquinamento da microplastica è a causa della sua persistenza negli ambienti e dai potenziali effetti sugli oceani, sulla fauna selvatica e sugli esseri umani. Tuttavia è difficile valutare la sua quantità per via delle piccole dimensioni delle particelle e delle ancora poche informazioni sulle reazioni chimiche e sull'estensione degli effetti sulla catena trofica. (Unep and Grid-Arendal, 2016; Jambeck, J. R. et al., 2015).

1.2. Le microplastiche

Le microplastiche sono particelle polimeriche il cui diametro è ancora oggi oggetto di dibattito tra gli studiosi. La National Oceanic and Atmospheric Administration (NOAA) negli Stati Uniti nel 2008 definisce microplastiche le particelle polimeriche il cui diametro non superi i 5 mm e con il nome di nanoplastiche tutte quelle particelle dal diametro inferiore ai 100 μm (Chae, Y. et al., 2017). L'Unione Europea ha seguito gli Stati Uniti e ha adottato un limite superiore di 5 mm per la categorizzazione delle microplastiche all'interno della direttiva quadro sulla strategia marina (MSFD, Galgani, F. et al., 2010). Dümichen E. et al. definiscono particelle polimeriche superiori ai 25 mm come macroplastiche, mentre tra i 5 e 25 mm come mesoplastiche; le particelle di polimero tra 1 e 5 mm vengono chiamate grandi microplastiche e minori di 1 mm piccole microplastiche (Dümichen E. et al. 2015; Ivleva, N.P. et al. 2017). Lamber S. e Wagner M., invece suggeriscono di ridefinire i diversi termini usati per indicare plastiche di piccole dimensioni, definendo come microplastica, le particelle comprese tra 1 mm e 0.1 μm , come mesoplastica gli elementi compresi tra 1 e 2.5 mm e il termine nanoplastiche usato

per indicare tutti quei frammenti inferiori al 0.1 μm (Lambert, S. et al.,2018). In sintesi, non esiste una definizione universalmente accettata sulle dimensioni delle microplastiche. Tuttavia, il limite superiore di 5 mm è generalmente accettato perché questa dimensione è in grado di includere un intervallo di piccole particelle che possono essere facilmente ingerite dagli organismi, mentre rimane un ridotto consenso sul limite inferiore delle dimensioni. (Thompson, R. C.,2015; Gesamp., 2015). Oltre che su base dimensionale, le microplastiche sono ovviamente suddivise su base compositiva. I polimeri che più generalmente vanno a costituire le microplastiche sono il PE, il PP, il PS, il PET ed il PVC, le cui fonti originarie sono principalmente bottiglie di plastica, contenitori per il cibo, reti da pesca, posate, pellicole e bicchieri di plastica (Vlachogianni Th.et al., 2017). La classificazione delle microplastiche può avvenire anche sulla base della fonte che li origina: ne sono esempio i pellets e i microbeads (sferette plastiche utilizzate in molti prodotti per l'igiene quotidiana), si presentano in forme appiattite, cilindriche, sferoidali o discoidali e sono considerate microplastiche primarie, cioè plastiche volutamente realizzate per essere di dimensioni microscopiche. Viceversa le microplastiche derivanti da disgregazione di rifiuti di maggiori dimensioni, sia i frammenti erosi, dalla morfologia molto più irregolare, sia le fibre, le quali si presentano sotto forma di filamenti sottili ed allungati vengono definite come microplastiche secondarie.

1.2.1. Microplastiche primarie e secondarie

L'origine delle microplastiche sta alla base della loro classificazione in primarie e secondarie; se le particelle sono originariamente fabbricate in modo da essere di quella dimensione vengono definite "microplastiche primarie", se invece sono il risultato della frammentazione di elementi più grandi vengono definite "microplastiche secondarie" (Fig. 1.6 – 1.7). Questa classificazione è di fondamentale importanza per l'identificazione delle fonti e sulle eventuali misure di mitigazione atte a ridurre il loro contributo in ambiente. Anche le fonti delle microplastiche vengono suddivise in terrestri (Fig. 1.8) e marine (Fig. 1.9).

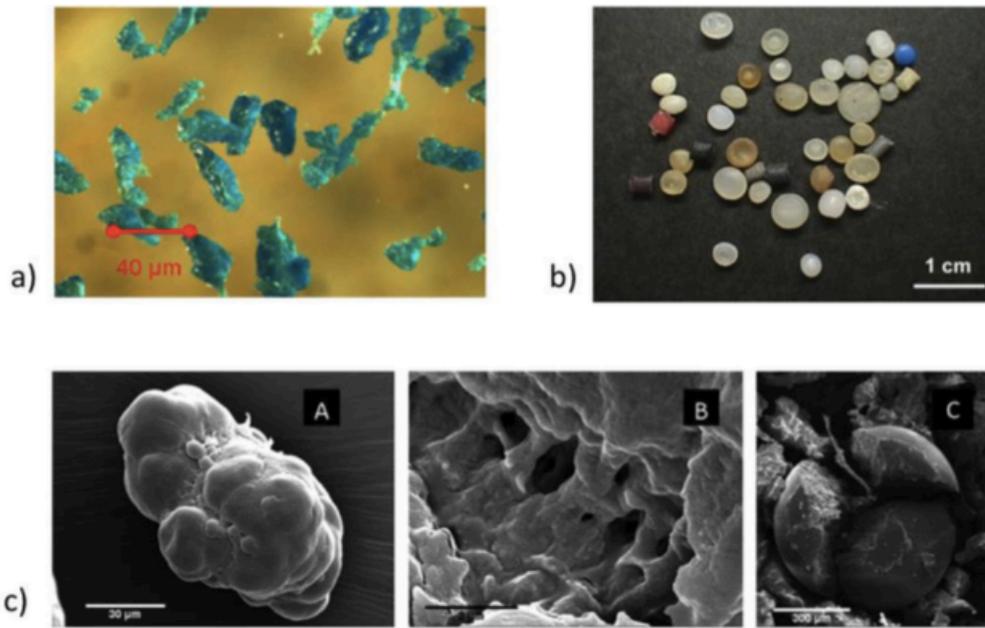


Figura 1.6: Microplastiche primarie: a) microplastiche abrasive estratte dal dentifricio; b) granuli di resina plastica raccolti dal litorale; c) microsfele di plastica estratte da scrub facciali viste al microscopio elettronico a scansione. Fonte: Unep., 2016

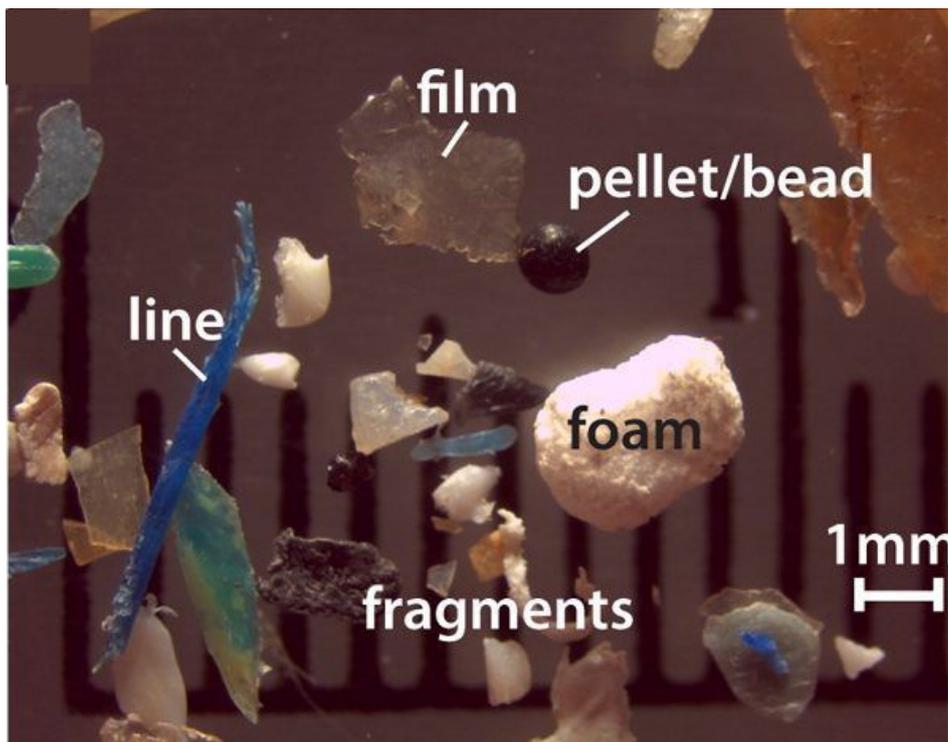


Figura 1.7: Esempi di diverse tipologie di Microplastiche secondarie come frammenti, fibre e schiume. Fonte: http://www.mlive.com/news/index.ssf/2016/09/microplastic_fibers_great_lake.html

Principali fonti terrestri:

➤ Microplastiche primarie:

- Prodotti per la cura personale e prodotti cosmetici (PCCPs):

Microsfere ampiamente utilizzate come agenti abrasivi e riempitivi in una vasta gamma di prodotti cosmetici e per la cura personale, come scrub viso, dentifrici, gel doccia e filtri solari.

- Pellet di resina:

L'industria della plastica tende a produrre e trasportare materie plastiche come pellet di resina circolari o cilindrici, grandi alcuni millimetri di diametro. Questi vengono utilizzati da strutture dove la plastica viene ulteriormente lavorata e per arrivare alla produzione di un prodotto finito.

- Abrasivi industriali – polveri d'iniezione – polveri stampanti 3D:

Gli abrasivi industriali spesso utilizzati per la pulizia degli scafi delle navi per rimuovere la crescita biologica e consentire la verniciatura spesso sono responsabili della potenziale origine di due tipi di microplastiche rilasciate in ambiente: la polvere abrasiva di plastica originale (primaria) e le scaglie di vernice (secondaria), costituite da una base polimerica. Le polveri d'iniezione e le polveri per le stampanti 3D sono micro particelle plastiche che vengono utilizzate per lo stampaggio di diversi materiali; la cattiva gestione di smaltimento causa spesso il loro rilascio in oceano (Unep,.2016).

➤ Microplastiche secondarie:

- Polveri plastiche da pneumatico:

Una delle potenziali fonti di particelle plastiche recentemente riconosciuta è l'emissione di polveri plastiche dovute all'usura degli pneumatici. Gli pneumatici si corrodono quando vengono utilizzati. I detriti sono formati dalle parti esterne del pneumatico e sono costituite da una matrice di polimeri sintetici, vale a dire gomma stirene - butadiene (circa il 60%), in un miscuglio con gomma naturale e molti altri additivi. La polvere degli pneumatici potrà essere quindi dispersa dal vento o lavata dalla strada dalla pioggia.

- Fibre tessili sintetiche:

I lavaggio di tessuti sintetici, nelle lavanderie industriali e casalinghe crea microplastiche secondarie attraverso l'abrasione e la perdita di fibre. Le fibre vengono poi scaricate nelle acque di scarico e potenzialmente finiscono in oceano. Importanti quantità di queste fibre tessili sono state osservate in molti studi di campionamento in situ sia in acque aperte che in sedimenti marini. Queste fibre sono tipicamente fatte di poliestere, polietilene e acrilico. (Boucher J. et al.,2017).

- Processi di frammentazione:

il processo di frammentazione subito da macroplastiche esposte ai diversi agenti atmosferici (moto ondoso, raggi UV, Salinità, Ossidazione, attacco microbico) è una delle potenziali fonti di microplastiche secondarie in oceano.

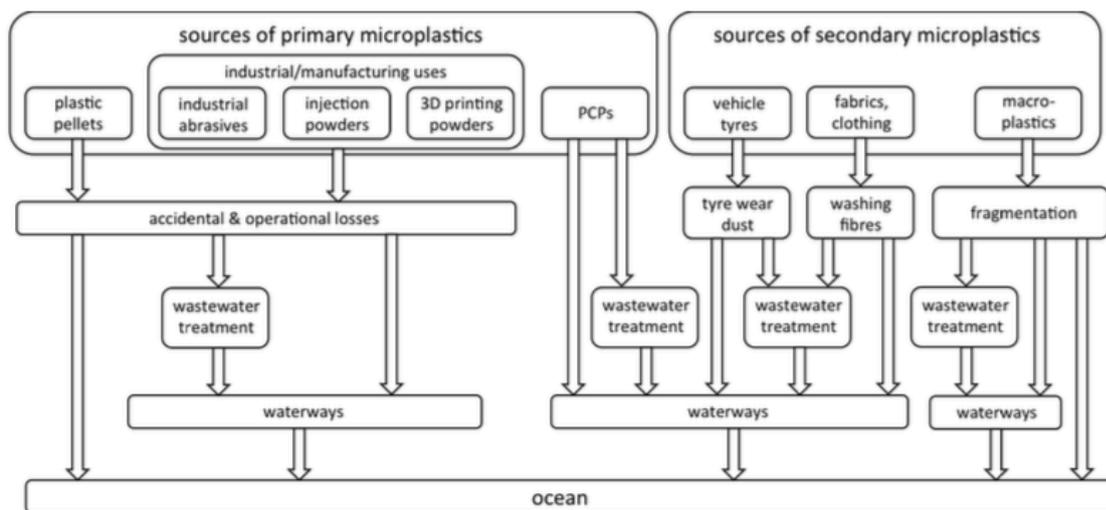


Figura 1.8: le principali fonti terrestri e punti d'ingresso di microplastiche primarie e secondarie verso l'oceano Fonte: UNEP, 2016

Principali fonti marine:

- Microplastiche primarie:

- Resina plastica:

La principale fonte di microplastiche primarie in mare è dovuta all'introduzione di perle di resina plastica a seguito di una perdita accidentale del carico.

- Prodotti per la cura personale e prodotti cosmetici (PCCPs):

Una fonte minore è rappresentata dall'uso di PCCPs, in particolare dai passeggeri delle navi turistiche.

➤ Microplastiche secondarie:

- Pesca:

Grazie ai molteplici vantaggi offerti dalla plastica, l'uso di materiali plastici nel settore della pesca commerciale è ampiamente diffuso, rispetto alle fibre naturali tradizionali. I materiali che finiscono in mare per abbandono, perdita o smaltimento illecito comprendono un'ampia varietà di oggetti, ad esempio gli attrezzi da pesca, come reti, corde, galleggianti e lenze da pesca; oppure oggetti ausiliari come guanti, vaschette per il pesce, nastri di reggiatura, rifiuti di cucina, fibre e altri frammenti dovuti alla normale usura e strappo (es. uso di funi di terra). L'importanza di questo problema è stata riconosciuta formalmente alla sedicesima riunione della commissione per la pesca della FAO nel 1985 e ha portato alla pubblicazione di un rapporto chiave della FAO e dell'UNEP (Lusher, A.L. et al., 2017; Unep 2016).

- Acquacoltura:

Per acquacoltura si intende l'allevamento di organismi acquatici, principalmente pesci, crostacei e molluschi, in ambienti confinati e controllati dall'uomo. La maggior parte delle attività di acquacoltura prevede l'utilizzo di corde, gabbie, reti e galleggianti spesso costituiti da materiale plastico. Tali strutture a causa di condizioni meteorologiche avverse, incidenti, perdite e usura, possono potenzialmente finire in oceano generando grandi quantità di detriti plastici marini. (Lusher, A.L. et al., 2017).

- Usi ricreativi:

L'uso ricreativo dell'oceano da parte dell'utenza, con particolare riferimento agli utenti delle comunità di immersioni, surf, pesca sportiva, attività nautiche ecc. è responsabile dell'apporto non indifferente di detriti plastici in oceano. Le cause possono essere di varia natura come l'usura delle attrezzature in uso e l'abbandono accidentale o intenzionale. Anche se le quantità effettivamente perse non sono note, gli usi ricreativi sono stati identificati come una fonte puntuale di detriti plastici di origine marina in oceano.

- Crociere turistiche

Se consideriamo che ogni anno il settore crocieristico coinvolge milioni di utenti e che ogni singola nave da crociera è in grado di ospitare fino a diverse migliaia di persone, generando di conseguenza una quantità equivalente di rifiuti plastici, è possibile indentificare il settore crocieristico come una fonte puntuale di detriti plastici di origine marina in oceano. Anche se negli ultimi anni le navi moderne dispongono di sistemi di gestione dei rifiuti molto sofisticati, molti di essi vengono ancora accidentalmente riversati in mare o depositati a terra nei porti di piccole isole o città con infrastrutture di scarico e gestione dei rifiuti inadeguate. (Gesamp,..2015)

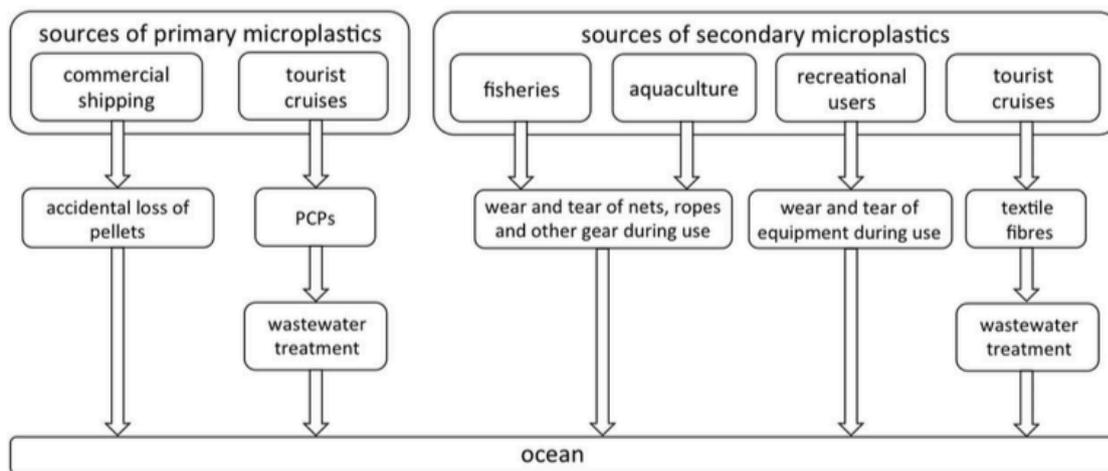


Figura 1.9: le principali fonti marine e punti d'ingresso di microplastiche primarie e secondarie verso l'oceano Fonte: Unep,..2016

Oltre alle microplastiche sintetiche, negli oceani possono essere presenti biopolimeri naturali (Fig. 1.10). Tuttavia, indipendentemente dalla loro dimensione delle particelle, queste sono meno preoccupanti perché sono generalmente biodegradabili e sono meno idrofobiche rispetto alle plastiche sintetiche. La maggior parte dei polimeri naturali si biodegrada facilmente in CO₂ e H₂O negli oceani. I biopolimeri sono sempre stati presenti negli oceani a differenza delle microplastiche le cui origini sono recenti. Anche se le microplastiche superano di molto gli oggetti in plastica di grandi dimensioni nei sistemi marini, costituiscono ancora solo una piccola parte della massa totale di plastica in oceano. Ciò significa che anche se fossimo in grado di fermare lo scarico di rifiuti macroplastici in mare oggi, il continuo degrado dei rifiuti più grandi già in mare e sulle spiagge porterebbe

probabilmente ad un aumento prolungato delle microplastiche per molti anni a venire (Gesamp, 2015).

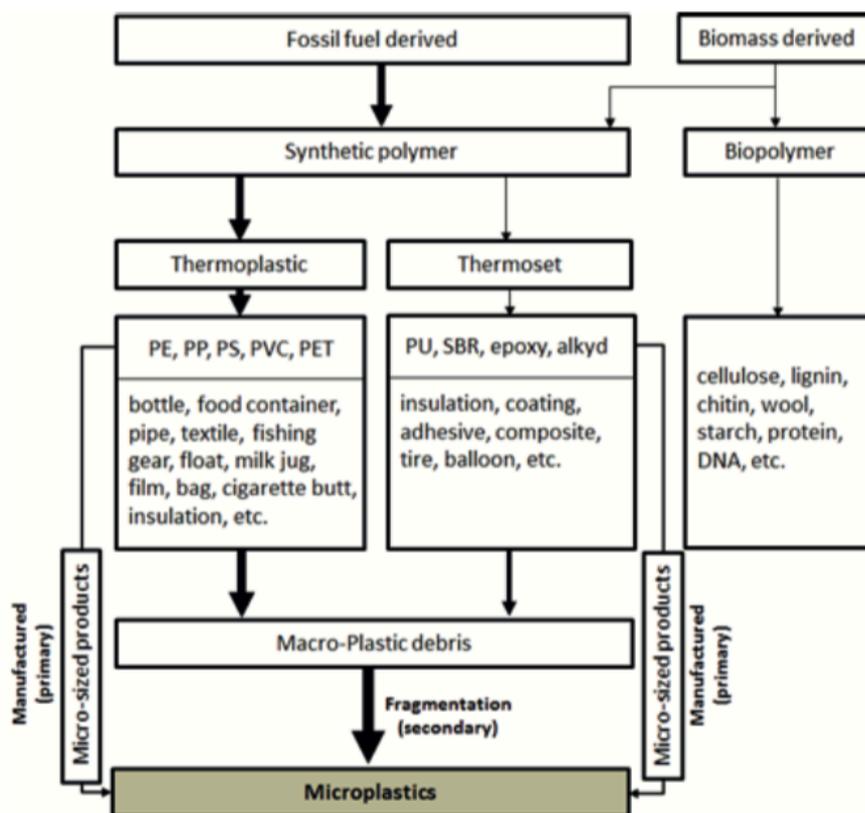


Figura 1.10: Produzione dei più comuni polimeri artificiali (plastici) e naturali, comprese alcune applicazioni tipiche. Tutte le materie plastiche possono essere soggette a frammentazione per esposizione ambientale e degradazione in microplastiche (secondarie). La percentuale di plastica che raggiunge l'oceano per trasformarsi in rifiuti di plastica dipende dall'efficacia della catena di riutilizzo, riciclaggio e gestione dei rifiuti. Fonte: Gesamp, 2015.

1.2.2. Da macro a micro: processi di degradazione e frammentazione

La longevità delle materie plastiche è tutt'ora materia di dibattito e le stime vanno da centinaia a migliaia di anni. Si ritiene che tutta la plastica comune (PE, PET, PVC, PS, PP, PUR) che sia mai stata introdotta nell'ambiente rimanga ancora non mineralizzata in elementi interi o frammenti. Tuttavia, dal momento che l'uomo produce plastica su larga scala da circa 70 anni, è prematuro fornire una stima del grado di persistenza in ambiente. Nonostante la durata di questi polimeri, gli oggetti di plastica si frammentano in ambiente come conseguenza della prolungata esposizione a diversi processi meccanici (vento, onde, morso di animale e attività umana) biologici (attività microbiche) e fotochimici (radiazione UV) (Barnes, D.K.A. et al., 2009). Il maggiore agente degradante della plastica è la radiazione solare

UV, che determina l'ossidazione dei polimeri. Tale processo definito fotodegradazione comprende una serie di reazioni di ossidazione mediate dai radicali liberi. In particolare sono le radiazioni UV-B e UV-A ad essere maggiormente efficaci nella fotodegradazione dei polimeri (Andrady, A. L.,2011). La completa degradazione si riferisce alla distruzione della catena polimerica e alla sua completa conversione in piccole molecole come il biossido di carbonio (CO₂) o il metano (CH₄). Poche materie plastiche subiscono degrado o mineralizzazione completa nell'ambiente marino, ed è proprio per la loro persistenza che sono state identificate come una grave minaccia per gli ecosistemi marini. Le macroplastiche presenti sulle coste o in mare esposte agli agenti atmosferici iniziano a creparsi in superficie e a frammentarsi in parti sempre più piccole. Ciò è particolarmente evidente sulle coste, in cui la fotodegradazione e l'abrasione fisica attraverso l'azione delle onde rendono fragili gli oggetti di plastica, aumentandone la frammentazione; mentre sia i tassi di alterazione degli agenti atmosferici che il grado di frammentazione sono inferiori su materie plastiche galleggianti in superficie o in colonna d'acqua e nei sedimenti marini (Andrady, A.L.,2015). Questo perché sulle spiagge vi è una maggiore radiazione UV, una maggiore abrasione meccanica e temperature più elevate. Tuttavia, il degrado della plastica può essere ostacolato da un insieme di fattori, ad esempio le basse temperature dell'acqua, la presenza di bio-incrostazioni sulla superficie delle particelle plastiche e la presenza di additivi. Il bio-fouling delle materie plastiche galleggianti nell'oceano è onnipresente e spesso porta ad una considerevole crescita di organismi sulle superficie delle plastiche, proteggendo la plastica dagli UV solari e rallentandone il processo di degradazione (Galgani, F.,2015). I prodotti in plastica possono incorporare una gamma di additivi selezionati per modificare le proprietà della resina vergine. Questi additivi in genere modificano il tasso di degradazione ossidativa (e quindi i tassi di alterazione degli agenti atmosferici) delle materie plastiche (Barnes, D.K.A et al.,2009). Ad esempio, gli stabilizzanti UV e termici e gli antiossidanti usati come additivi spesso ritardano marcatamente la degradazione del materiale plastico indotta dalla luce. Inoltre, non vi sono dati certi sull'invecchiamento delle materie plastiche presenti sulle coste, galleggianti sulla superficie e soprattutto immerse nella colonna d'acqua o nei sedimenti (Andrady, A.L., 2011). Attualmente non esistono metodologie affidabili per determinare l'età delle microplastiche raccolte sul campo, rendendo molto difficile studiare la

dinamica di degradazione delle microplastiche nei sistemi marini da campioni raccolti in campo. La mancanza generale di informazioni è una lacuna molto significativa nelle conoscenze scientifiche pertinenti. La mancanza di dati su come gli effetti combinati della foto-ossidazione, della frammentazione, dell'abrasione meccanica e delle sostanze chimiche additive influenzano la formazione di microplastiche è un ostacolo significativo alla produzione di affidabili modelli quantitativi per descrivere il comportamento della plastica e delle microplastiche in oceano.

1.2.3. Processi di trasporto di microplastiche in ambiente marino

I processi che determinano il trasporto delle microplastiche in ambiente marino sono influenzati da un insieme di fattori, tra cui fattori fisici chimici e biologici, natura della plastica e sorgente di entrata. Prima di poter valutare correttamente i rischi, diventa essenziale capire come le microplastiche siano distribuite nello spazio, ad esempio tra le diverse regioni geografiche (temperate, tropicali e polari); tra mari aperti e relativamente chiusi (ad esempio il Mediterraneo e l'Oceano Pacifico) e tra i compartimenti (superficie del mare, sedimenti bentonici e ritenzione nel biota). I detriti plastici ritrovati sulle coste e in mare sono una miscela di più particelle di diversa origine e composizione, diffuse negli oceani attraverso le acque temperate e tropicali. La loro presenza è stata segnalata sia vicino le coste caratterizzate da un'elevata densità demografica sia in località più remote, come risultato del trasporto per lunghe distanze mediate dall'azione di correnti marine e venti (Gesamp.,2015). Più della metà della plastica che entra nell'ambiente marino è meno densa dell'acqua di mare, quindi finché non acquisisce un po' di zavorra, galleggia. Come già detto, la plastica una volta scartata, può accumularsi vicino al suo punto di entrata in oceano o spostarsi su lunghe distanze; questo, connesso con il lento tasso di degradazione della maggior parte della plastica, determina una permanenza in oceano per lungo tempo, diventando un vero problema di inquinamento transfrontaliero.

➤ Trasporto superficiale

il trasporto delle microplastiche sulla superficie dell'oceano dipende fortemente dal vento e dalle correnti marine. La circolazione oceanica, dovuta dall'azione combinata dei venti e della forza di Coriolis, connessa alla rotazione terrestre, ha l'effetto di spostare enormi volumi d'acqua superficiale formando grandi sistemi di correnti circolari (gyres) che agiscono come nastro trasportatore, muovendo e accumulando le plastiche galleggianti in corrispondenza di zone di convergenza, portando alla formazione delle cosiddette isole di plastica note con il termine "Trash Islands" (Fig. 1.11).



Figura 1.11: Questa foto mostra i rifiuti di plastica che galleggiano al largo della costa di Roatan, in Honduras, il 7 settembre 2017. Fonte:<http://www.themalaymailonline.com/features/article/trash-islands-off-central-america-indicate-ocean-pollution-problem#slBbjpfUxKXfEEkh.97>

I gyres rappresentano il principale meccanismo di trasporto per la dispersione dei detriti di plastica galleggianti (Barnes D.K.A. et al.,2009). Infatti, alte concentrazioni di detriti plastici galleggianti sono stati segnalati nelle zone centrali del Nord Atlantico e del Pacifico, ma diversi modelli di circolazione oceanica hanno suggerito possibili regioni di accumulo in tutti e cinque i Gyres subtropicali (Fig. 1.12) (Maximenko et al., 2012; Moore C.J. et al.,2001).

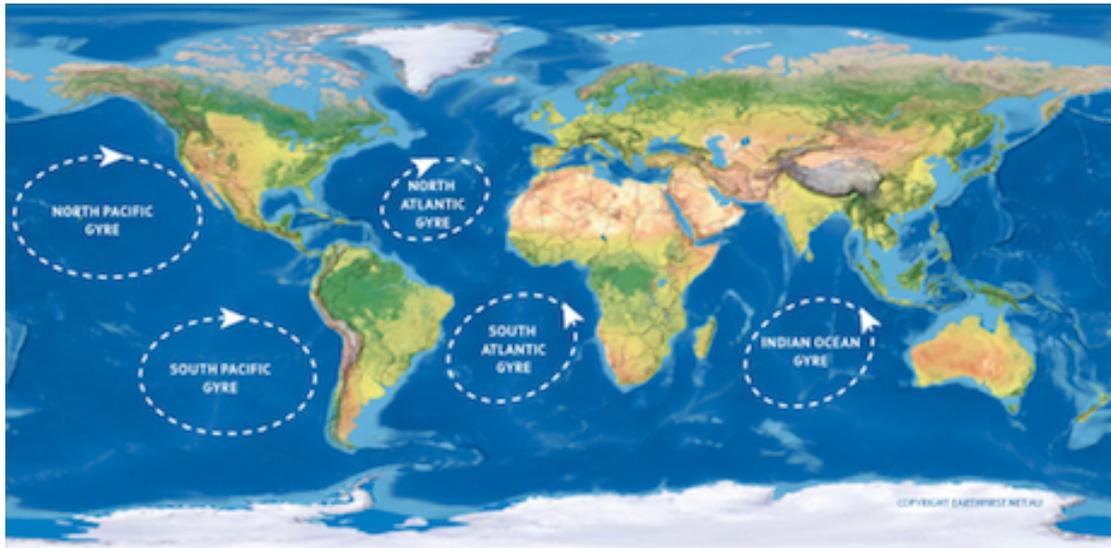


Figura 1.12: La circolazione superficiale nell'oceano è dominata da 5 grandi correnti circolari, detti Gyres. Come rappresentato in figura essi si trovano nel Nord e Sud Atlantico, nel Nord e Sud Pacifico e nell'oceano Indiano. Fonte: <https://it.pinterest.com/pin/11962755239497394/?lp=true>

Il meccanismo di accumulo delle plastiche nei gyres è determinato dal fatto che il flusso d'acqua marina, carico di particelle plastiche, diretto verso il centro del vortice subisce uno sprofondamento, affondando a profondità di alcune centinaia di metri, mentre la plastica galleggiante o in sospensione spinta verso il centro del vortice, avendo una densità minore dell'acqua, non subisce lo stesso destino ma rimane bloccata in sospensione all'interno della corrente convergente, contribuendo così alla formazione di grandi regioni di accumulo. In queste aree, la densità delle microplastiche è molto più elevata che in altre aree dell'oceano; nell'oceano pacifico in corrispondenza dei gyres, è stata stimata una densità di microplastica che varia da 25 000 particelle per km² a 300 000 particelle per km² (Maximenko et al.,2012; Unep.,2016). Elevati accumuli di particelle plastiche sono stati recentemente riscontrati anche nelle zone artiche ed antartiche. Inoltre anche mari chiusi o costieri (mar Mediterraneo, golfo del bengala) con zone costiere densamente popolate, sono state identificate come zone di accumulo di detriti plastici (Unep and Grid-Arendal.,2016).

➤ Trasporto sul fondale marino

I meccanismi che influenzano il trasporto e la distribuzione sul fondale marino delle microplastiche non sono ancora ben compresi. Si ipotizza che la combinazione della circolazione termoalina (Fig. 1.13) con i gyres subtropicali potrebbe fornire un meccanismo per una maggiore dispersione verticale delle particelle plastiche.

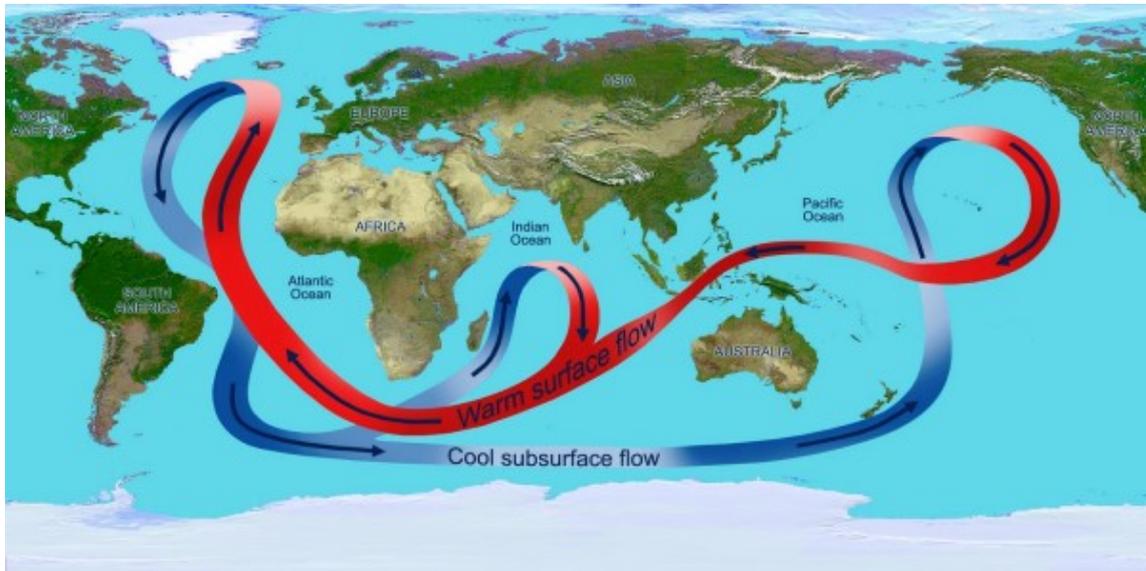


Figura 1.13: Per circolazione termoalina si intende la componente della circolazione globale oceanica causata dalla variazione della densità dell'acqua. La densità dell'acqua dipende dalla temperatura e dalla salinità. Fonte: <http://www.inmeteo.net/blog/2015/02/20/correnti-oceaniche-dinamiche-impatto-clima-globale/>

Le dinamiche oceaniche potrebbero quindi spiegare l'accumulo di plastica nelle acque profonde o meno profonde in relazione alle dimensioni e densità delle plastiche, alla forza delle correnti superficiali e di fondo, all'azione delle onde, alla topografia del fondale, alla variazione delle sorgenti e al grado di bio-fouling (Unep,.2016; Gesamp,.2016). Le correnti oceaniche profonde sono estremamente complesse e non è chiaro se ci siano schemi di circolazione vicino al fondale oceanico che potrebbero creare punti caldi di accumulo. Si potrebbe ipotizzare che le microplastiche si accumulino in canyon profondi (Fig. 1.14), poiché il materiale potrebbe col passare del tempo essere lentamente trascinato da una combinazione di turbolenza e gravità. Tuttavia, vi sono poche prove empiriche per questi modelli di accumulo ed in ogni caso, attualmente si sa poco del fondo oceanico e la mappatura è così costosa che una stima globale della quantità di plastica in oceano profondo potrebbe essere lontano decenni. (Van Cauwenberghe, L. et al.,2015-a; Unep and Grid-Arendal.,2016).

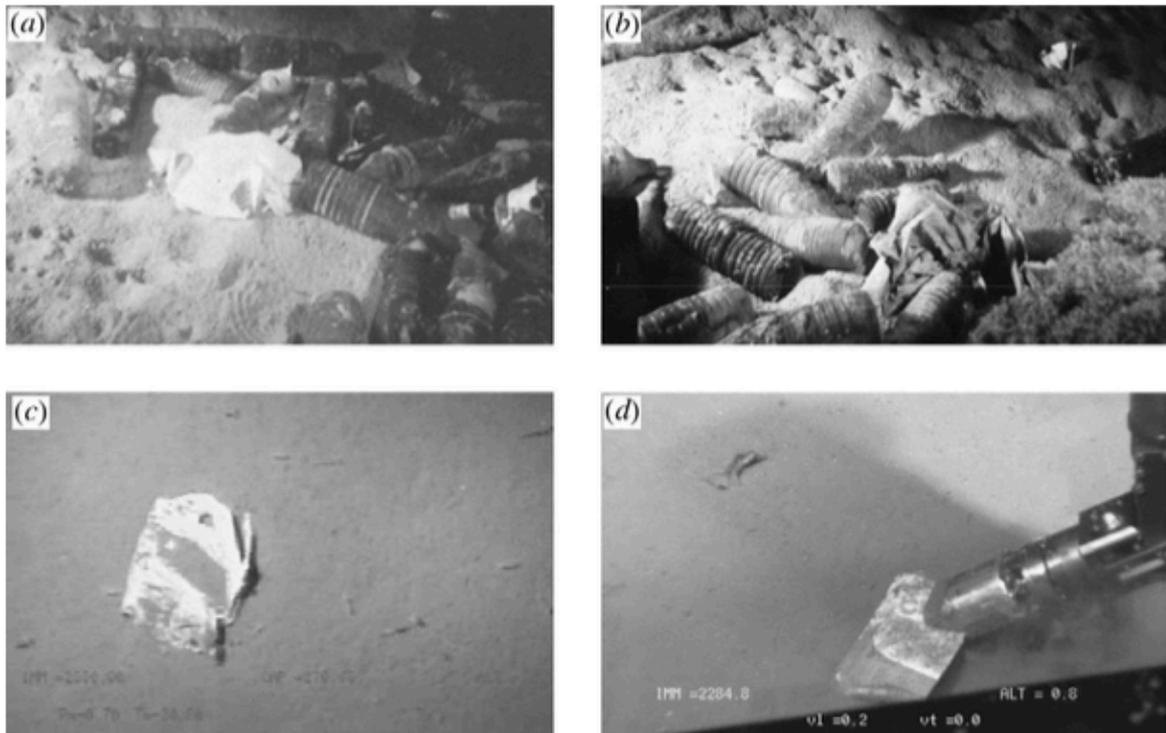


Figura 1.14: Accumulo di detriti in ambienti di acque profonde. Osservazioni sommergibili nei canyon del Mediterraneo (a e b: bottiglie di plastica a 1000 m di profondità in due diversi punti del canyon di Marsiglia, 4380300000 N, 0580000000 E) e sopra il circolo polare, sotto un lastrone di ghiaccio (c e d: sacchetti di plastica a ,2200 -2600 m di profondità a Hausgarten, stretto di Fram, 7980308000 N, 0481106000 E). Fonte: Barnes D.K.A et al., 2009

➤ Trasporto attraverso il Biota

I processi biologici, come bio-incrostazioni, ingestione e aggregazione, in combinazione con i processi fisici citati in precedenza e le proprietà delle particelle plastiche stesse (tipologia e densità) influenzano i meccanismi di trasporto delle microplastiche. Ad esempio alcune tipologie di plastica comune possiedono una densità inferiore a quella dell'acqua di mare (ad esempio il PP) pertanto galleggiano; il che significa che vi è una maggior probabilità d'ingestione da parte di organismi pelagici che si nutrono in superficie (Gesamp.,2016); è importante sottolineare che anche le plastiche a bassa densità possono affondare se colonizzate da organismi o aggregate a sostanze naturali o artificiali (Wang, S. et al.,2016). Al contrario le microplastiche con una densità maggiore (come il PVC e il PET) hanno maggiori probabilità di affondare e quindi di essere ingerite da organismi bentonici. Tra i processi biologici, l'ingestione da parte degli organismi gioca un ruolo fondamentale nella redistribuzione delle particelle di plastica all'interno dell'oceano, poiché le particelle possono essere rilasciate sia

nuovamente in altre aree dell'oceano quando gli organismi spostano la loro posizione che al di fuori dell'ambiente marino, ad esempio quando gli uccelli marini trasportano i detriti a terra (Unep and Grid-Arendal.,2016). Alcuni animali marini ingeriscono qualsiasi cosa rientri in un range di dimensioni appropriato, altri usano segnali visivi, chimici ed elettrici per trovare e selezionare il cibo, quindi la probabilità che un frammento di microplastica venga ingerito dipende, non solo dalla dimensione e dalla quantità presente, ma anche da una serie di altri parametri tra cui forma, colore, odore e sapore. In particolare l'odore e il sapore della microplastica vengono influenzati dalla presenza di biofilm costituito da microalghe (Galgani, F., 2015). Questo strato di materia organica sulla superficie delle microplastiche gli conferisce odore e sapore di particelle nutritive. Ciò aumenta la probabilità di ingestione da parte degli organismi che usano la chemio-recezione per selezionare le particelle di cibo. La probabilità di ingestione e l'impatto sull'organismo che la ingerisce varieranno a seconda della composizione della comunità microbica e se essa includa potenziali agenti patogeni. (Gesamp,.2016; Gesamp,.2015; Unep,.2016).

1.2.4. L'impatto delle microplastiche sugli ecosistemi marini.

L'impatto provocato dai detriti plastici e dalle microplastiche sugli ecosistemi marini è un argomento che negli anni ha suscitato un crescente interesse da parte delle istituzioni, dell'opinione pubblica e della comunità scientifica. Tale interesse è dovuto a causa degli impatti negativi non solo ecologici ma anche economici e sociali provocati dalla plastica in ambiente marino, rappresentando una grande minaccia, sia per la salute degli oceani e degli organismi marini che per l'uomo. Ogni anno centinaia di specie marine entrano in contatto con detriti di plastica tramite l'ingestione o l'intrappolamento. Una vasta gamma di tipi di plastica è coinvolta e gli effetti vanno dall'incagliamento di cetacei e pinnipedi in corde e reti, dovuto principalmente agli scarti della cosiddetta "pesca fantasma", al soffocamento di uccelli e tartarughe fino all'ingestione di frammenti microscopici di plastica da parte di pesci ed invertebrati (Galgani, F.,2015; Ivleva, N.P.,2017; Gregory, M.R., 2009). Gli incidenti da intrappolamento possono causare ferite, infezioni, strangolamento, annegamento, perdita di efficienza fisica e malnutrizione causata da un accumulo di plastica nello stomaco (Fig. 1.15).



Figura 1.15: Esempi di intrappolamento dovuti agli scarti delle attrezzature da pesca.

Questi effetti sono stati ampiamente segnalati per una varietà di mammiferi marini, rettili, uccelli e pesci (Unep, 2016; Unep and Grid-Arendal, 2016; Stap, 2011; Ivleva, N.P., 2017). È stato stimato che ogni anno su scala globale tra i 57 000 e 135 000 pinnipedi e balene finiscono impigliati negli scarti della pesca, oltre ad innumerevoli pesci, uccelli e tartarughe (Unep, 2016); nel periodo compreso tra il 1970 e il 2009, più 300 balene di grandi dimensioni nell'atlantico nord-occidentale si pensa siano morte a causa dell'intrappolamento; mentre in Australia tra il 2005 e il 2012 sono state raccolte più di 8 000 reti disperse in mare, presumibilmente responsabili della morte di oltre 14 000 tartarughe (Unep and Grid-Arendal, 2016). Uno degli aspetti principali dell'inquinamento da plastica, oltre all'intrappolamento, è l'ingestione delle microplastiche. L'ingestione è stata ampiamente dimostrata sia in studi di laboratorio che sul campo su numerosi organismi marini tra i quali zooplancton, policheti, bivalvi, crostacei, pesci demersali e pelagici, uccelli marini, rettili e mammiferi. (Barnes, D.K.A., 2009; Galgani F., 2015; Avio, C. G. et al., 2015a; Taylor, M. L., 2016; Ivleva N.P., 2017). La quantità di microplastica ingerita dipende dalle dimensioni e dalla composizione delle microplastiche ma anche dal tipo di

organismo che se ne nutre. Vari studi hanno dimostrato una correlazione tra assorbimento e dimensione, affermando che minori sono le dimensioni delle particelle maggiore sarà il range di assorbimento da parte della fauna, provocando impatti sulla salute dei singoli individui (Van Cauwenberghe, L., & Janssen, C. R., 2014 e riferimenti in esso riportati). Ad esempio è stato documentato che l'ingestione di particelle di PS da parte dello zooplancton ha ridotto significativamente il loro apporto nutrizionale e anche la loro capacità riproduttiva; nei bivalvi in specie come *Mytilus galloprovincialis* (Lamarck, 1819) e *Mytilus edulis* (Linnaeus, 1758) le particelle di PS ingerite venivano trasferite nel sistema circolatorio e accumulate nelle cellule epiteliali del sistema digerente anche solo dopo 3 ore dall'esposizione (Avio, C.G. et al., 2015b; Vandermeersch, G. et al., 2015). In mammiferi, tartarughe e uccelli marini prove di ingestione spesso provengono dalla dissezione delle carcasse (sono stati trovati grandi quantità di materiali plastici nei tratti gastrointestinali), che rappresentano solo una piccola percentuale rispetto al numero totale degli individui colpiti (Unep., 2016). Oltre al rischio fisico derivante dall'ingestione diretta o indiretta (tramite consumo di prede contaminate) delle microplastiche, vi è una crescente preoccupazione relativa alla presenza di sostanze chimiche pericolose intrinseche alla plastica o successivamente adsorbite sulla superficie (Dehaut, A. et al., 2016; Gesamp., 2015; Gregory, M.R., 2009). Come già descritto in precedenza, un'ampia gamma di prodotti chimici viene utilizzata come additivi nella produzione di materie plastiche, utili per migliorare le caratteristiche, aumentarne la trasparenza, la flessibilità, la longevità e la resistenza alla degradazione dei raggi UV; alcuni di questi additivi come BPA, ftalati e ritardanti di fiamma bromurati sono potenzialmente dannosi in quanto associati ad effetti cancerogeni ed endocrini (Barnes, D.K.A., 2009; Galgani F., 2015). Nell'acqua di mare, la plastica, a causa della bassa polarità delle superfici, è anche nota per adsorbire e concentrare i contaminanti presenti in ambiente da altre fonti. Questi contaminanti che includono inquinanti organici persistenti come i bifenili policlorurati (PCB), gli idrocarburi policiclici aromatici (IPA), il diclorodifenildicloroetilene (DDE) e il nonilfenolo, possono diventare di diversi ordini di grandezza più concentrati sulla superficie dei detriti di plastica che nell'acqua di mare circostante (Ivleva, N.P., 2017; Barnes, D.K.A., 2009). È stato ampiamente suggerito che questi contaminanti adsorbiti e gli additivi chimici utilizzati nella fabbricazione potrebbero successivamente essere rilasciati se le

materie plastiche fossero ingerite. Le piccole particelle di plastica possedendo una superficie specifica, disponibile per l'adsorbimento delle sostanze chimiche, maggiore rispetto ai detriti più grandi, rappresentano una via probabile per il trasferimento di tali sostanze. Dati sulla tossicità di questi contaminanti organici sono ben conosciuti e sono stati tradotti dalla Comunità Europea in norme alimentari (ECR, 2011 a e b). Tuttavia rimane oggetto di approfondimento e studio il tasso di adsorbimento e rilascio di tali sostanze dalle plastiche. Un altro possibile rischio associato alla microplastica è un rischio di tipo biologico derivante dalla potenziale presenza di microrganismi dannosi in grado di vivere sulla plastica; Infatti è noto che le microplastiche possono anche funzionare come vettore di potenziali patogeni attraverso l'ecosistema marino (Vandermeersch, G. et al., 2015). Le grandi quantità di detriti rilasciati in oceano hanno aumentato notevolmente le quantità di materiale da trasporto, aumentando così le opportunità per la dispersione di molti e vari organismi marini; la superficie idrofoba dei detriti marini stimola la colonizzazione microbica, portando alla formazione di quelle che vengono definite barriere microbiche (Galgani, F., 2015; Gregory, M.R., 2009). Comprendere la varietà di specie associate alle plastiche, valutare l'impatto di questi meccanismi sulla dispersione di tossicità e patogenicità, comprendere il trasporto su vasta scala di detriti e specie associate sarà di fondamentale importanza per la gestione del rischio biologico associato alle microplastiche in mare. La crescente evidenza scientifica che varie specie marine, tra cui quelle che stanno alla base della catena trofica, ingeriscono e accumulano microplastiche indica che queste particelle stanno entrando nella catena alimentare con un potenziale impatto sulla sicurezza alimentare e sulla salute umana (Fig. 1.16) (Van Cauwenberghe, L., & Janssen, C. R., 2014). La contaminazione da microplastiche nell'uomo è definita indiretta in quanto dovuta all'ingestione di cibo già contaminato, sono stati riscontrati diversi effetti negativi su cellule e tessuti umani, sono noti casi di reazioni allergiche, asma, cancro e problemi cardiaci potenzialmente riconducibili alle microplastiche e alle sostanze chimiche in esse presenti (Gesamp, 2015).

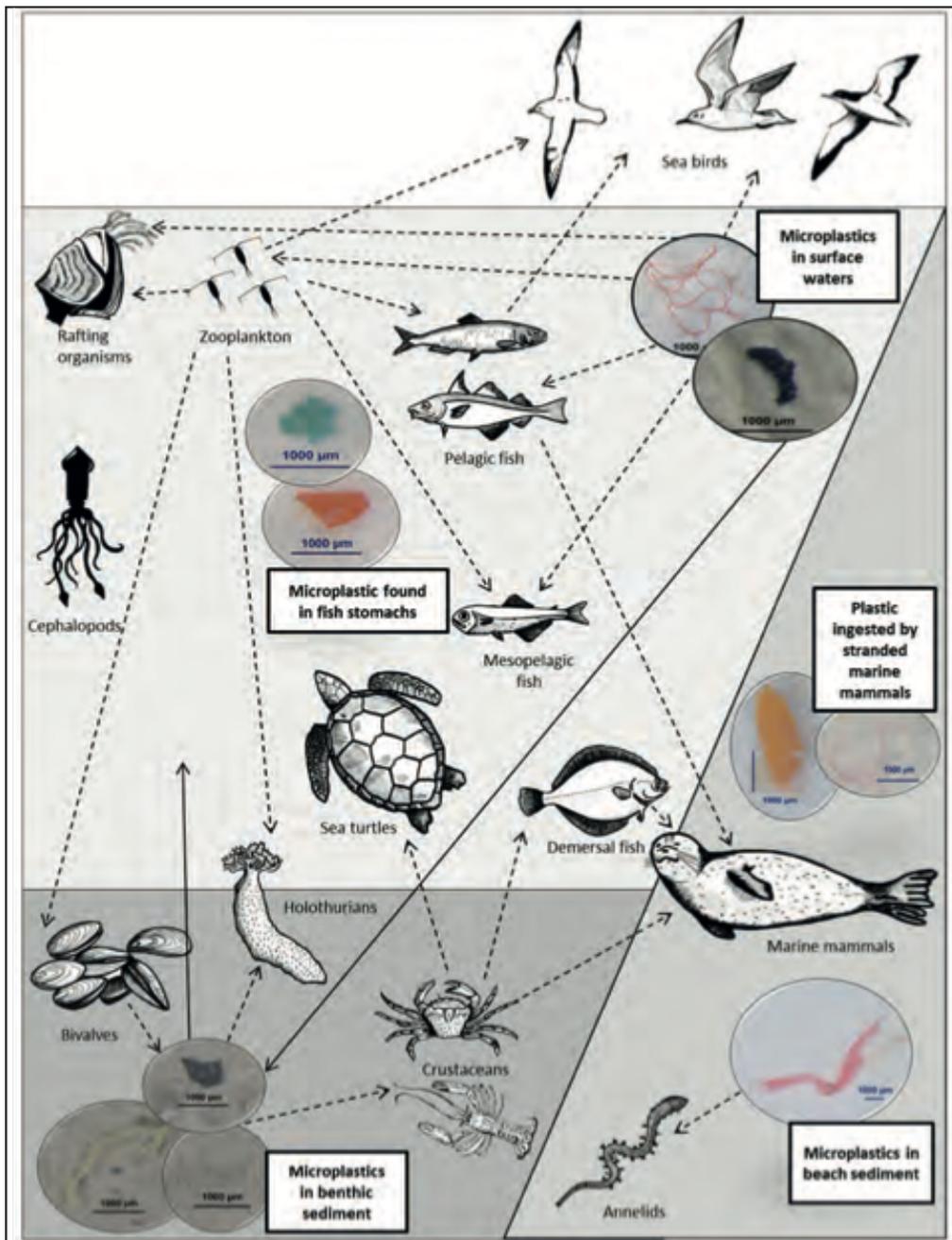


Figura 1.16: Interazioni microplastiche con matrici fisiche e biologiche nell'ambiente marino. Le frecce continue rappresentano i collegamenti ambientali (cioè come la microplastica si può trasferire tra i sedimenti e l'acqua) e le frecce tratteggiate rappresentano collegamenti biologici (cioè, come la microplastica può trasferire tra i livelli trofici). Fonte: Gesamp., 2016

1.3. Metodi di campionamento e pretrattamento

L'analisi delle microplastiche rappresenta una nuova sfida per gli scienziati analitici. Le piccole dimensioni complica la loro determinazione nei campioni ambientali rispetto ai macroplastici e richiede approcci analitici sempre più sofisticati. La matrice campione, indipendente dal compartimento ambientale campionato, contiene un carico elevato di particelle di origine naturale che interferiscono fortemente con il rilevamento visivo delle microplastiche. Pertanto, sono necessari metodi adatti per la preparazione del campione per estrarre microplastiche e ridurre il numero di particelle naturali. Inoltre, un metodo analitico per l'identificazione e la conferma delle particelle di plastica è obbligatorio per ottenere risultati affidabili (Klein, S. et al. 2018). In letteratura sono stati descritti diversi metodi di campionamento, trattamenti di campioni e metodi di rilevamento (Fig. 1.17).

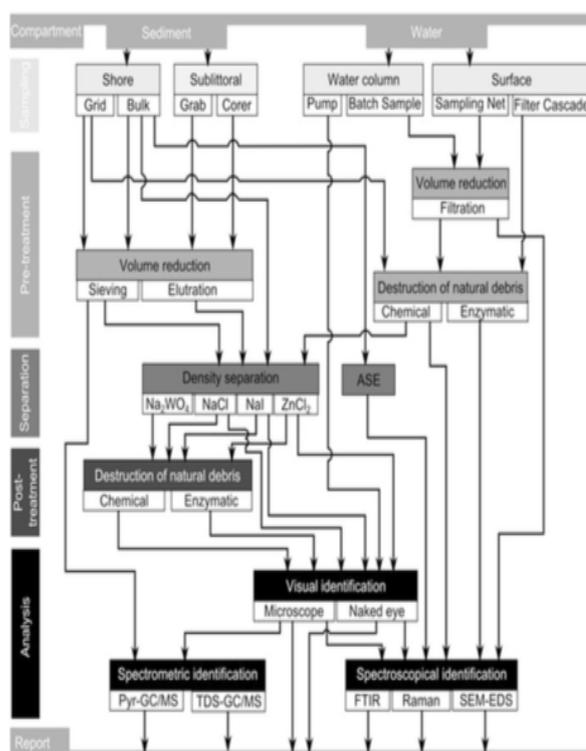


Figura 1.17: Possibili strategie descritte in letteratura per l'analisi di microplastiche nei campioni di sedimenti e acqua a partire dal campionamento alla relazione dei risultati. La preparazione del campione è suddivisa in pretrattamento, separazione della densità e post-trattamento delle microplastiche separate. Spettroscopia infrarossa a trasformazione di Fourier (FTIR), spettroscopia a raggi X a dispersione di energia al microscopio elettronico a scansione (SEM-EDS), gas - cromatografia a desorbimento termico o pirolitico / spettrometria di massa (Py-GC / MS, TDS-GC / MS) Fonte: Klein, S. et al 2018.

Il campionamento di microplastiche in ambiente dipende fortemente dal compartimento interessato. In generale, ciò può essere differenziato tra il campionamento della fase acquosa (acqua superficiale, colonna d'acqua), campionamento della fase sedimento (sedimenti costieri, sedimenti lacustri) e il campionamento del biota (pesci, mitili, crostacei).

1.3.1. Campionamento in acqua

In conseguenza delle ridottissime dimensioni, del peso e della densità relativa, le microplastiche tendono ad accumularsi preferibilmente sulla superficie del mare e, in seconda battuta, nella zona basale del termoclino. Per tale ragione occorre rilevare le variabili chimico-fisiche lungo la colonna d'acqua calando la sonda multi-parametrica in corrispondenza del punto di inizio del campionamento delle microplastiche. È importante anche tenere conto degli effetti del rimescolamento causato dal moto ondoso sulla distribuzione delle microplastiche ed è quindi preferibile eseguire il campionamento in condizioni di mare calmo. La raccolta di (micro) plastica dall'acqua viene comunemente eseguita con reti. Il campionamento può avvenire in superficie o in colonna d'acqua.

Per sondare la superficie del mare, vengono applicate varie reti, ad esempio reti da traino, reti neuston o reti tipo "manta" costruita appositamente per navigare nello strato superficiale della colonna d'acqua e campionare quindi entro lo strato interessato dal rimescolamento causato dal moto ondoso. Per la colonna d'acqua si utilizzano principalmente reti di plancton. Un altro strumento comune per la ricerca di plancton che può essere applicato anche al campionamento microplastico è il registratore continuo di plancton (CPR) (Vlachogianni, Th. et al 2017; Klein, S. et al 2018). Un grande vantaggio del campionamento con reti è che gli alti volumi possono essere gestiti molto rapidamente, ma comunque la dimensione delle maglie sono il fattore limitante. Poiché le reti con piccole dimensioni di maglie tendono a bloccarsi facilmente, il loro utilizzo non è ragionevole. Di conseguenza, nella maggior parte degli studi è applicata una dimensione di maglie da 300 a 390 mm. Questo è conforme alla Marine strategy framework directive (MSFD), che consiglia una dimensione di maglia di 333 mm, una lunghezza netta totale di 6 m, e una durata di raccolta di 30 min. (Ivleva N.P. et al. 2017.) Successivamente i campioni una volta raccolti, vengono essiccati per ottenere una polvere solida (Dümichen E. et al. 2017).

1.3.2. Campionamento nei sedimenti

Particolarmente per i campioni di sedimenti, le particelle di microplastica (con intervallo di densità 0.90-2.30 kg/L⁻¹) (Fig. 1.18) devono essere separate da altre parti del sedimento come sabbia o pietre (densità circa 2.65 kg/L⁻¹). Per questa separazione, il frazionamento di densità è il metodo

usato maggiormente (Van Cauwenberghe, L. et al., 2015 - a). Il campione viene miscelato con un liquido di densità definita, normalmente una soluzione salina satura e quindi scosso, agitato e/o aerato per un tempo definito. Successivamente la miscela viene lasciata decantare e le particelle a

bassa densità come la (micro) plastica iniziano a galleggiare mentre le particelle ad alta densità precipitano sul fondo. Le particelle di plastica vengono quindi separate dalla filtrazione del surnatante. Il liquido più comunemente utilizzato è una soluzione satura di cloruro di sodio (NaCl) con una densità di 1.2 kg /L⁻¹, perché è facilmente disponibile, poco costoso e non tossico (Nuelle, M. T. et al., 2014; Ivleva, N.P. et al., 2017). Solo le plastiche a bassa densità galleggiano sulla superficie e possono quindi essere estratte, mentre le plastiche ad elevata densità precipitano sul fondo, per far fronte a questo problema è possibile utilizzare sostanze chimiche ad alta densità come ioduro di sodio (NaI). Tuttavia, queste sostanze sono costose da usare: 1 kg di NaCl costa meno di 1 euro, mentre 1 kg di NaI costa circa 70 euro. Sali utilizzati oltre a NaCl e NaI sono CaCl₂, ZnCl₂, SPT (3Na₂WO₄·9WO₃·H₂O, sodio politungstato) (Claessens, M. et al., 2013).

Per migliorare e semplificare l'identificazione, i campioni devono essere purificati. È possibile applicare due diversi metodi per la purificazione: degradazione chimica e degradazione enzimatica della matrice organica. Nella prima procedura i

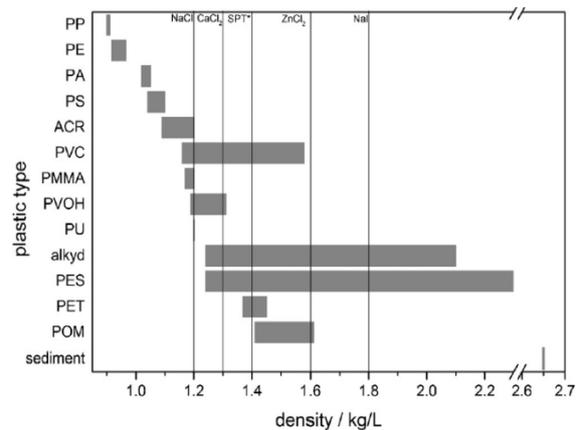


Figura 1.18: Densità di diversi tipi di plastica [polipropilene (PP), polietilene (PE), poliammide (PA), polistirene (PS), acrilato (ACR), polivinilcloruro (PVC), polimetilmetacrilato (PMMA), alcool polivinilico (PVOH), poliuretano (PU), poliestere alchidico (PES), polietilene tereftalato (PET) e polioossimetilene (POM)] in soluzioni saline sature [cloruro di sodio (NaCl), cloruro di calcio (CaCl₂), cloruro di zinco (ZnCl₂) e ioduro di sodio (NaI), così come sodio politungstato (SPT)]. * Densità più comunemente usata per SPT; questo dipende dalla concentrazione (max.3.1 kg.L⁻¹ per soluzione satura) Fonte: Ivleva N.P. et al. 2017.

campioni possono essere trattati con diverse sostanze chimiche, ad esempio soluzioni acquose al 30% di perossido di idrogeno (H_2O_2) o miscele di H_2O_2 e acido solforico (H_2SO_4) (Nuelle, M. T. et al., 2014). Altri gruppi usano un bagno ad ultrasuoni (Wagner, J. et al 2017), tuttavia, non è consigliabile in quanto può generare microplastiche da particelle grossolane di plastica fragile. Per il degrado enzimatico i campioni di microplastica possono essere trattati con una miscela di enzimi tecnici (lipasi, amilasi, proteinasi, chitinasi e cellulasi). Poiché questo approccio è abbastanza nuovo, è necessario eseguire ulteriori studi per dimostrare se la purificazione è fattibile per l'analisi di routine. (Ivleva, N.P. et al., 2017)

1.3.3. Campionamento nel biota

Studi sul campo hanno dimostrato che le microplastiche vengono ingerite da una grande pluralità di taxa marini che rappresentano vari livelli trofici, come uccelli e mammiferi marini, pesci, bivalvi e crostacei (Gesamp, 2015). Per quanto riguarda pesci, bivalvi e crostacei, la maggior parte dei campioni, sono raccolti tramite serie di campionamenti della durata di 30 minuti con velocità della nave inferiore ai 4 nodi e tramite l'utilizzo di reti a strascico, reti a circuizione e reti da traino pelagiche, riuscendo a coprire un intervallo di profondità tra i 10 e 281 m a seconda dell'area di campionamento. Per ogni retata vengono registrati luogo, data e profondità della pesca e i campioni immediatamente dopo la cattura vengono congelati o avviati alla fase successiva dello studio che prevede principalmente, previa digestione del materiale organico tramite trattamenti enzimatici, chimici (Fischer, M., & Scholz-Böttcher, B. M. 2017; Cole, M. et al., 2014) o ossidativi (Nuelle, M. T. et al., 2014; Avio, C. G., 2015a), l'analisi del contenuto stomacale, delle branchie e dei tessuti. (Vlachogianni, Th. et al., 2017). Il campionamento degli uccelli si basa sul recupero di esemplari morti, di solito da litorali o siti di nidificazione costiera, ad esempio dalle isole del medio oceano. Il contenuto stomacale degli uccelli può contenere oggetti di plastica che coprono uno spettro di ampie dimensioni, mentre i tessuti tendono a contenere intervalli di dimensioni molto più piccole perché le particelle più piccole hanno maggiori probabilità di essere trasferite dal tratto gastrointestinale (Gesamp., 2015).

1.4. Metodi di identificazione e quantificazione

Dopo aver separato e purificato le particelle plastiche devono essere identificate e quantificate. La caratterizzazione delle microplastiche può essere effettuata tramite l'applicazione di diversi metodi fisici o chimici (Fig. 1.19 – 1.20).

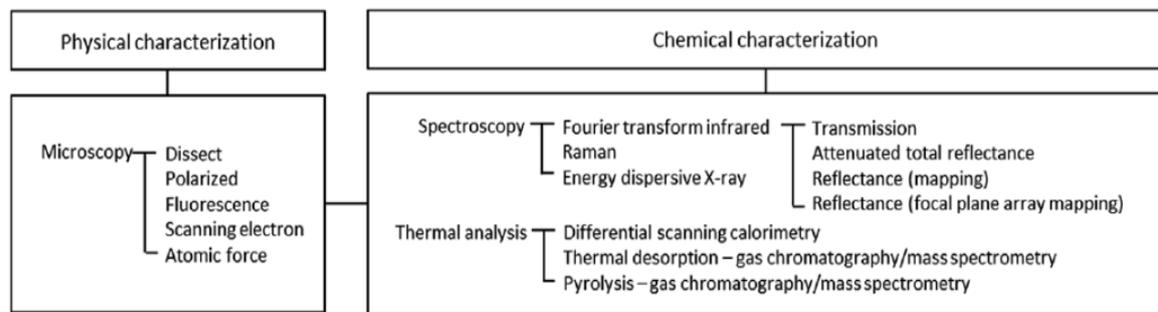


Figura 1.19: Metodi di caratterizzazione fisica e chimica attualmente utilizzati per l'analisi microplastica. Fonte: Shim, W. J et al. 2017

1.4.1. Metodo visivo

L'identificazione delle microplastiche avviene tramite osservazione ad occhio nudo o l'utilizzo di microscopi ottici (dissezione, polarizzatore e fluorescenza), elettronici e a scansione di sonda (es: AFM, Atomic Force Microscopy). La quantificazione avviene tramite la conta manuale di tutte le microparticelle presenti. Sebbene la classificazione visiva sia utilizzata in molti studi, i valori ottenuti non possono considerarsi affidabili, in quanto dipendono fortemente dall'operatore che applica il metodo. La principale problematica sta nella difficoltà di distinzione tra particelle plastiche e non (come quarzo, silicati di alluminio, parti vegetali o animali) (Shim, W. J. et al., 2017).

1.4.2. Metodo di tintura

Consiste in un metodo di supporto all'identificazione visiva, tramite il trattamento del campione con il rosa bengala (4,5,6,7-tetracloro-2',4',5',7'-tetraiodofluoresceina sodica), colorante che permette la tintura di particelle organiche naturali (es: fibre di cellulosa) (Ivleva N.P. et al. 2017). Il materiale non colorato viene quindi identificato come microplastico. Tutta via solo l'analisi spettroscopica (FTIR o RM) può fornire una prova inequivocabile della natura sintetica delle particelle/fibre non colorate (Camacho, W. & Karlsson, S., 2001). Un altro svantaggio della sola identificazione visiva è la mancanza di informazioni sulla tipologia di plastica dei campioni. Questo consente solo conclusioni limitate sulla

sorgente e rischio ambientale del campione, poiché diversi tipi di plastica presentano diversi gradi di tossicità derivanti dall'utilizzo di additivi, plastificanti e coloranti.

1.4.3. Metodi strumentali

Esistono diversi metodi strumentali utilizzati per la caratterizzazione delle (micro) plastiche; i più comuni sono la spettroscopia ad infrarossi a trasformata di Fourier (FTIR), la spettroscopia Raman (RS, RM se accoppiato con microscopio) e metodi termo-analitici (Py-GC-MS; TGA).

- La spettroscopia ad infrarossi a trasformata di Fourier (FTIR):

La spettroscopia ad infrarossi a trasformata di Fourier è una tecnica spettroscopica in cui vengono analizzate le vibrazioni molecolari di un campione e le sue caratteristiche peculiari (cosiddette impronte digitali) per poi essere confrontate con campioni di riferimento (Gago, J. et al., 2016). La spettroscopia FTIR dispone di tre diverse modalità di funzionamento: trasmissione, riflessione e modalità di riflessione totale attenuata (ATR). L'ATR viene applicata per grandi microplastiche (> 500 μm); Il campione viene posto su un cristallo ATR e la superficie viene irradiata con un'onda ad infrarossi. Ciò consente un'analisi FTIR di microplastica più grande con un'identificazione veloce e precisa (Mistri, M. et al., 2017). Per le particelle più piccole, è necessario applicare la combinazione di FTIR con un microscopio ottico, il cosiddetto micro-FTIR, che può essere utilizzato in tutte e tre le modalità, generalmente le particelle di microplastica vengono raccolte su un filtro (Galgani, F. et al., 2011; Ivleva N.P. et al. 2017). I principali disagi di questi metodi sono la procedura di scansione che richiede tempo, la loro rappresentatività, la loro robustezza, la presenza di interferenze (acqua, materia organica, particelle, riflessioni, ecc.) e la preparazione richiesta del campione; quindi, questi metodi sono difficili da implementare come analisi di routine.

- Spettroscopia Raman

La spettroscopia Raman (RS) può essere utilizzata per la caratterizzazione delle microplastiche; tramite l'utilizzo di un laser il campione viene irradiato provocando diverse frequenze di luce, a seconda della struttura molecolare e degli atomi

presenti, produce uno spettro unico per ogni polimero (Gago, J. et al.,2016; Shim, W. J et al. 2017). Successivamente gli spettri vengono confrontati con degli standard. L'analisi Raman non solo identifica le materie plastiche, ma fornisce anche profili della composizione polimerica di ciascun campione. Spesso RS è associata ad un microscopio ottico standard, tale complesso prende il nome di micro-spettroscopia Raman (RM). I vantaggi nell'utilizzo del RM sono riconducibili ad un'elevata risoluzione spaziale (fino ad 1 μ m) e ad una insensibilità all'acqua. Una corretta focalizzazione della luce laser sulle particelle plastiche per la mappatura risulta essere complicata, pertanto si rende necessario lo sviluppo di ulteriori sistemi di messa a fuoco automatizzati. Tramite la RS e RM è possibile esaminare sia particelle plastiche di grandi (>500 μ m) e piccole dimensioni (su filtro) (1 – 20 μ m) sia fibre plastiche (1 μ m). A differenza del micro-FTIR, specialmente quando viene implementata la modalità di trasmissione, RM consente anche l'analisi di particelle scure e non trasparenti (Ivleva N.P. et al. 2017). Uno dei maggiori inconvenienti di RM (e RS) è l'interferenza di fluorescenza di fondo da contaminazioni (micro) biologiche, organiche (es: sostanze umiche) e inorganiche (es: minerali argillosi) che ostacolano l'identificazione. Pertanto, i campioni dovrebbero essere sottoposti ad una fase di purificazione prima dell'analisi Raman. Inoltre, la scelta dei parametri di acquisizione appropriati (lunghezza d'onda laser, potenza laser, tempo di misurazione, ingrandimento dell'obiettivo, modalità confocale) è importante per aggirare il problema di una forte resistenza alla fluorescenza.

1.4.4. Metodi Termici: Pirolisi analitica e Termogravimetria

I metodi termo-analitici, che permettono di misurare i cambiamenti nelle proprietà fisiche e chimiche dei polimeri in funzione della loro stabilità termica, sono stati testati per lo studio delle particelle di microplastica.

- Pirolisi analitica accoppiata a gas-cromatografia e spettrometria di massa:
Un metodo ben consolidato per l'analisi dei polimeri e delle microplastiche è la pirolisi e successiva analisi in gas-cromatografia e spettrometria di massa (Py-GC-MS) (Fabbri, D., 2001; Fischer, M., & Scholz-Böttcher, B. M. 2017). Le singole particelle di polimero vengono pirolizzate in tubo di quarzo in condizioni inerte ad

una temperatura solitamente di 700 °C per 10s (Fabbri, D., 2001; Kusch, P., 2012). I prodotti di degradazione termica sono prima intrappolati e poi separati utilizzando una colonna cromatografica e successivamente identificati con spettrometria di massa. Gli spettri dei prodotti di pirolisi sono quindi confrontati con un database di tipi di plastica comuni. Un'analisi quantitativa può essere effettuata tramite la costruzione di una curva di calibrazione ottenuta mediante il confronto tra le diverse concentrazioni di polimero standard e il rapporto tra l'area del picco cromatografico dello ione molecolare identificativo del polimero e l'area di uno standard interno a concentrazione nota (Fischer, M., & Scholz-Böttcher, B. M. 2017). Questo metodo funziona molto bene per singoli pezzi e può essere applicato per i campioni con peso compreso tra 0.1 e 0.5 mg; pertanto è necessaria una preselezione delle singole particelle. Inoltre, questo metodo è soggetto a contaminazioni. Particolarmente durante la pirolisi, i prodotti di degradazione dei polimeri ad alto peso molecolare (oltre 400 g/mol⁻¹) vengono condensati nel piccolo capillare di trasferimento (dal compartimento di pirolisi a GC-MS, diametro di circa 1 mm), che viene riscaldato ad una temperatura massima di 350 e 400 C° (Dümichen E. et al. 2017). Ne consegue una manutenzione molto elevata.

- Termogravimetria:

L'analisi termogravimetrica (TGA) è una tecnica analitica quantitativa che permette, tramite una microbilancia ad alta sensibilità, di misurare minime variazioni della massa di un campione in funzione del tempo e della temperatura immergendo il campione stesso in una atmosfera gassosa controllata; permette la rilevazione di reazioni di ossidazione o decomposizione e di ottenere informazioni sulla composizione del materiale e sulla sua stabilità (Majewsky, M. et al., 2016). Nel caso dei polimeri, il riscaldamento provoca delle modificazioni chimiche con scissione dei legami che di solito portano alla formazione di prodotti volatili. Questo metodo può essere utilizzato per le analisi di routine per determinare i valori di concentrazione dei polimeri specifici direttamente in campioni ambientali senza alcuna preselezione o preparazione del campione. Dümichen E. nel 2015 ha presentato uno studio in cui viene applicato questo metodo come combinazione di analisi termogravimetrica (TGA) su adsorbitori a fase solida (TGA-SPE) e successiva analisi di questi adsorbitori con desorbimento termico, gas-cromatografia e spettrometro di massa (TDS-GC/MS). Tale

combinazione prende il nome di termo-estrazione a desorbimento accoppiata a gas cromatografia e spettrometria di massa (TED-GC/MS). I campioni ambientali, compresi i componenti organici e le particelle microplastiche (fino a 20 mg), vengono collocati in un crogiolo TGA e pirolizzati in condizioni inerte a temperature controllate fino a 1000°C (Dümichen E. et al. 2017). I prodotti di degradazione specifici del polimero, sono intrappolati sugli adsorbitori a fase solida. L'analisi con un sistema GC-MS rende possibile l'identificazione. Anche se in questo metodo si perdono le informazioni sulla distribuzione delle dimensioni, poiché le particelle polimeriche si fondono prima del degrado, il metodo può fornire misure veloci. Tutta via l'applicazione del metodo TED-GC-MS può consentire solo di trarre conclusioni riguardanti la frazione totale di massa dei polimeri coinvolti. Di conseguenza, una grande particella porterà allo stesso risultato di tante piccole particelle, senza fornire informazioni sul numero totale e la distribuzione delle dimensioni delle microplastiche. La TGA rimane comunque un metodo robusto ed è stato costruito per misurare anche i campioni che rilasciano una quantità elevata di composti con una massa molecolare elevata. (Dümichen E. et al. 2017; Ivleva N.P. et al. 2017). Contrariamente all'uso di Py-GC-MS, si è in grado di trattare campioni con masse relativamente elevate (circa 200 volte superiori a quelle utilizzate in Py-GC-MS) permettendo la misura di matrici complesse che non sono omogenee su piccola scala (Dümichen E. et al. 2015). L'analisi termica fornisce un metodo alternativo alla spettroscopia per l'identificazione chimica di alcuni tipi di polimeri. Tuttavia, è un metodo distruttivo, impedendo ulteriori analisi dei campioni microplastici.

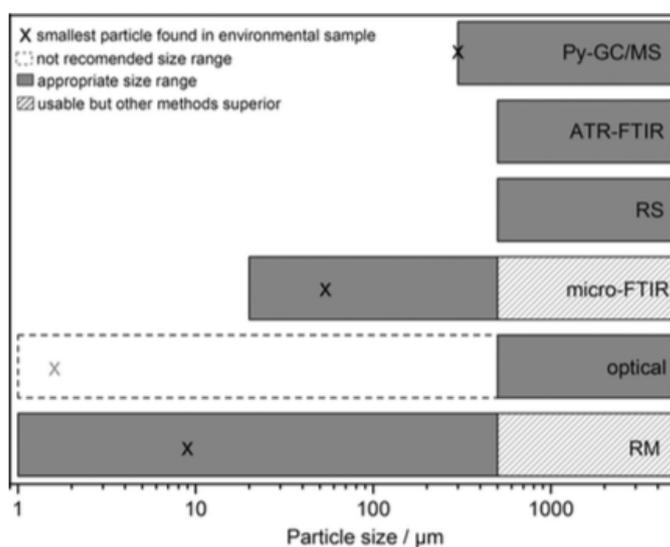


Figura 1.20: Panoramica delle dimensioni microplastiche analizzate mediante i diversi metodi di identificazione Fonte: Ivleva N.P. et al. 2017

1.5. Il polistirene

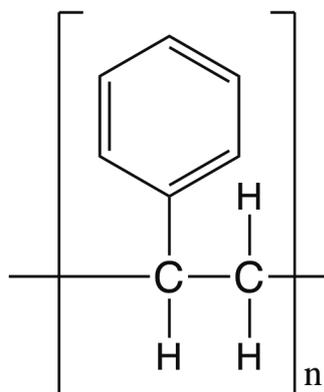
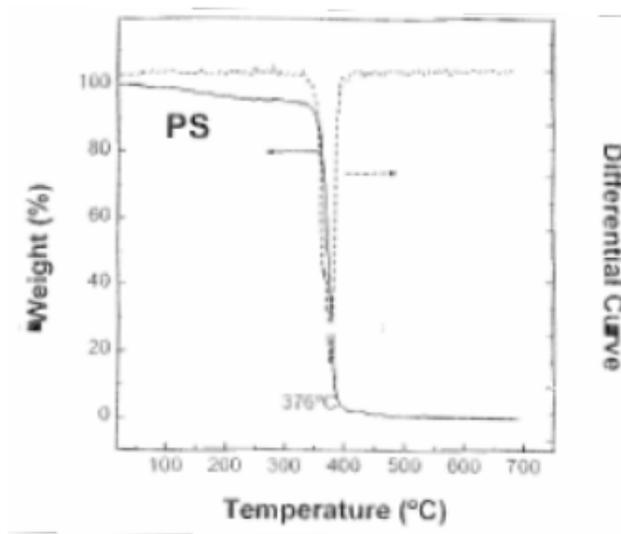


Figura 1.21: formula di struttura del polistirene

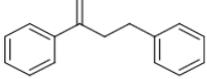
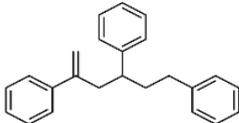
Il polistirene (PS) (Fig.1.21) è un polimero aromatico, scoperto nel 1839 dallo speziale berlinese Eduard Simon. Egli distillò una sostanza oleosa, conferendogli il nome di stirolo, dalla resina di un albero appartenente alla specie *Liquidambar orientalis*, albero a foglie decidue tipico delle regioni del Mediterraneo orientale. Alcuni giorni dopo si accorse che tale composto si era trasformato in una pasta gelatinosa; inizialmente pensò che il fenomeno fosse dovuto ad una reazione di ossidazione del composto stesso, ma nel 1845 i chimici John Blyth e August Wilhelm von Hofmann dimostrarono che la stessa trasformazione dello stirene potesse avvenire anche in assenza di ossigeno. Ciò portò gli studiosi alla conclusione che il PS non era altro che il prodotto della polimerizzazione dello stirene (sostanza presente in natura nei semi di fagiolo e di caffè, nel luppolo, nelle noci e nelle fragole o prodotta industrialmente dalla raffinazione del petrolio) (Wünsch, J. R. 2000). La polimerizzazione dello stirene è un processo che può avvenire, seppur con tempi molto lunghi, anche a temperatura ambiente; è una reazione di addizione avviata dalla presenza di prodotti, detti “iniziatori” che permettono la formazione di radicali, come i perossidi. Il PS è un polimero aromatico termoplastico dalla struttura lineare, con buone proprietà elettriche, resiste a diversi agenti chimici, tra cui acidi e basi deboli e presenta un basso tasso di assorbimento d’acqua. Con una densità pari a circa 1.050 g/cm^3 , è solubile nei solventi organici clorurati (diclorometano e cloroformio), in trielina, acetone e in alcuni solventi aromatici come benzene e toluene; è poco resistente ai raggi UV e possiede una stabilità dimensionale solo fino ai $70 \text{ }^\circ\text{C}$. Si presenta

come solido vetroso a temperatura ambiente; al di sopra dei 100 °C acquisisce plasticità ed è in grado di fluire; presenta una temperatura di degradazione a partire da circa 350°C. (Fig. 1.22) (Westerhout, R.W.J. et al. 1997; Wünsch, J. R. 2000; Dümichen E. et al. 2017;).



*Figura 1.22: TGA del PS in atmosfera d'azoto
Fonte: modificata da Dümichen E. et al. (2017)*

In letteratura esistono numerose descrizioni dei meccanismi di degradazione termica del PS, nella maggior parte dei lavori, il prodotto maggiormente ottenuto è il monomero di partenza, cioè lo Stirene. Questo risultato è ottenuto sia ad alte che a basse temperature di degradazione. In uno studio condotto da Dümichen E. et al. (2017), mirato all'identificazione delle microplastiche nei campioni ambientali tramite metodi di degradazione termica, afferma che Il PS si scioglie termicamente principalmente per scissione a catena. Queste reazioni portano alla formazione di stirene e frammenti oligomerici di PS. Con il metodo di estrazione e desorbimento termico associato a gascromatografia e spettrometria di massa (TED-GC-MS) sono stati identificati tre principali prodotti di degradazione termica: stirene (PS 1), 2,4-difenil-1-butene (dimero) (PS 2) e 2,4,6- trifenil-1-esene (trimero) (PS 3). I tre prodotti di degradazione termica vengono tenuti in considerazione per l'identificazione di PS nei campioni ambientali (Fig. 1.23).

No.	RT/min	Compound	Structure	Formula	m/z (i.r.)
PS 1	6.49	Styrene		C ₈ H ₈	104(100), 78(41,2), 51(18,3)
PS 2	26.9	2,4-Diphenyl-1-butene		C ₁₆ H ₁₆	91(100), 104(24,2), 208(21,8), 130(17,8)
PS 3	39.93	2,4,6-Triphenyl-1-hexen		C ₂₄ H ₂₄	91(100), 117(30,4), 207(23,2), 194(16,4)

i.r.- intensity ratio in % in relation to largest peak in the fragment pattern.

Figura 1.23: composti di degradazione termica selezionati per l'identificazione di PS. Fonte: Dümichen E. et al. (2017).

In Figura 1.24 è mostrato un raffronto tra i cromatogrammi ottenuti dalla TED-GC-MS di PS espanso (EPS) e PS estruso (XPS), da questo grafico si può notare come non esistano differenze nei prodotti di degradazione. Così, una determinata identificazione può essere effettuata indipendentemente dal tipo di PS. Tuttavia, l'abbondanza di stirene nel cromatogramma EPS è molto bassa, mentre le abbondanze del dimero e del trimero sono comparabili (in questo caso per la quantificazione può essere escluso lo stirene). Lo stirene ha un basso punto di ebollizione, circa 145 C°, vicino alla temperatura di estrazione (circa 120 C°). Ciò porta ad un ridotto adsorbimento dello stirene e quindi ad una sensibilità ridotta. Tuttavia, il dimero e il trimero presentano rispettivamente punti di ebollizione di 309 C° e 448 C° e sono adatti per l'identificazione del PS. È stato inoltre osservato che la formazione di monomero, dimero e trimero dipende anche dalle condizioni di estrazione termica (Dümichen E. et al. 2017).

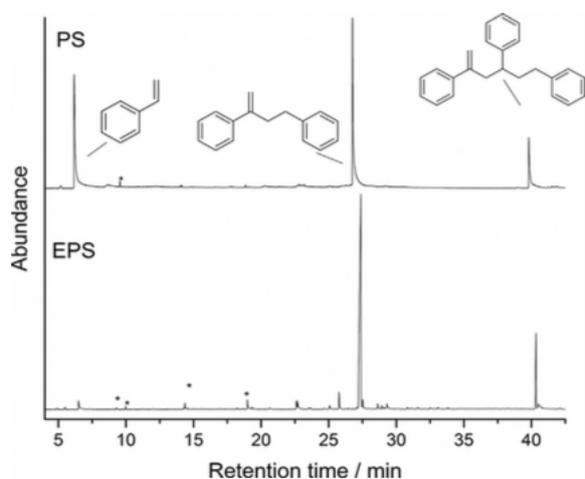
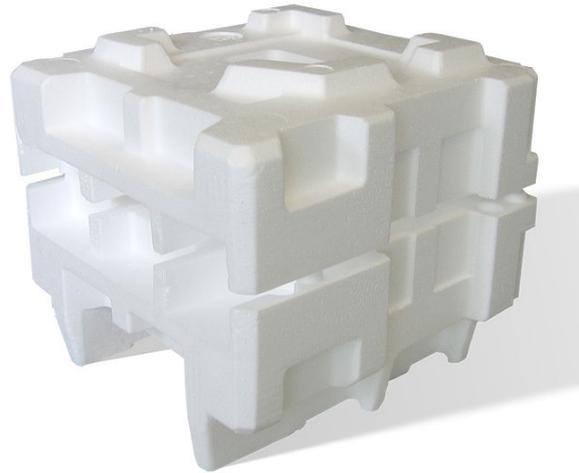


Figura 1.24: Cromatogramma TED-GC-MS di PS (sopra) ed EPS (sotto) con specie identificate (picchi contrassegnati con * derivati dal materiale adsorbente). Fonte: Dümichen E. et al. 2017

Le molteplici proprietà del PS lo rendono adatto alla preparazione di manufatti a basso costo, trasparenti e dotati di brillantezza; esempi sono i contenitori per l'imballo dolciario, parti di apparecchiature elettriche, giocattoli e prodotti per la casa. Sul mercato spesso ne esistono di diverse tipologie: polistirene espanso sinterizzato (EPS), polistirene espanso estruso (XPS) e Polistirene antiurto (HIPS).

➤ Polistirene Espanso Sinterizzato (Expanded polystyrene-EPS)

Il polistirene *espanso* (Fig. 1.25) (meglio conosciuto come polistirolo) si presenta in forma di schiuma bianca leggerissima, spesso modellata in sferette o chips. la sua densità varia da 15 kg/m^3 a 100 kg/m^3 . Si ottiene immergendo i granuli di PS in una soluzione acquosa contenente dal 2% al 8% di pentano. Tramite un processo di compressione, il pentano, insolubile in acqua, si diffonde nei granuli. Successivamente, i granuli posti



*Figura 1.25: polistirene espanso sinterizzato (EPS).
Fonte: <https://en.wikipedia.org/wiki/Cushioning>*

all'interno di una camera con una parete mobile vengono trattati con vapore acqueo ad una temperatura di circa $120-130 \text{ }^\circ\text{C}$ che ne determina il rammollimento e il successivo rigonfiamento causato dall'ebollizione del pentano; ottenendo così delle sferette di schiuma di PS (Wünsch, J. R. 2000).

➤ Polistirene espanso estruso (Extruded polystyrene foam - XPS)

Il polistirene espanso estruso (Fig. 1.26) ha le stesse caratteristiche del polistirolo ma si presenta in modo più compatto ed ha la superficie liscia che consente di realizzare prodotti più prestigiosi dal punto di vista strettamente estetico. Il processo di sintesi prevede la fusione dei granuli di PS all'interno di un estrusore a vite senza fine; in cui viene insufflato del gas in



Figura 1.26: Polistirene espanso estruso (XPS).
Fonte: <http://tm-drevkov.ru/costo-polistirene-espanso-estruso/>

pressione permettendo la fuoriuscita del fuso nella forma desiderata attraverso una trafila posta in testa all'estrusore. All'uscita, la differenza di pressione determina la schiumatura del gas dal PS. La densità che normalmente raggiunge in questo modo è di circa 35 kg/m^3 ma è possibile raggiungere densità variabili dai $25\text{-}28 \text{ kg/m}^3$, fino a circa 50 kg/m^3 . (Wünsch, J. R. 2000)

➤ Polistirene antiurto (High Impact Polystyrene -HIPS)

Il polistirene antiurto (Fig. 1.27) è costituito da PS e gomma stirene-butadiene (gomma SBR), combinati per ottenere una plastica meno fragile del PS generico. L'HIPS grazie alla presenza della gomma SBR presenta, rispetto al PS comune, delle proprietà peculiari, come una maggiore resistenza alla rottura, maggiore resistenza all'urto, maggiore resistenza alla deformazione permanente (Jody, B. J. et al., 1997).



Figura 1.27: contenitore yogurt realizzato in HIPS.
Fonte: <https://www.ilpa-mp3.com/it/prodotti-bobine/ps/mp-stir.htm>

Il PS è una delle materie plastiche maggiormente utilizzate in tutto il mondo, con una produzione annua di oltre 23 milioni di tonnellate all'anno (Lithner et al., 2011). Questo polimero persiste per diverse centinaia di anni nell'ambiente e subisce una depolimerizzazione estremamente lenta nelle acque marine, portando così alla formazione di micro e nano-detriti. Nel 2008, la produzione globale di PS ha raggiunto 15,4 milioni di tonnellate, e circa il 20% di questo è stato consumato in Cina, rappresentando uno dei 6 Paesi in cui si ha la maggiore percentuale di plastica rilasciata negli oceani (Saïdo, K. et al.,2014; PlasticsEurope, 2016; Bergami et al, 2016). Pertanto, il PS potrebbe rappresentare un serio pericolo per gli organismi marini, anche a causa delle proprietà del monomero del polistirene (stirene) noto come agente cancerogeno ed interferente endocrino (Lithner et al., 2011). In letteratura sono molteplici gli studi che segnalano gli effetti del PS sugli organismi marini, ad esempio in specie come *Mytilus galloprovincialis* le microsfele di polistirene vengono trasportate dal sistema circolatorio e tendono ad accumularsi nelle cellule epiteliali del sistema digerente (Avio, C.G. et al.,2015b). Nei pesci possono limitare l'acquisizione dei lipidi dalle riserve di grasso. In *Daphnia magna* portano ad una riduzione della crescita, sopravvivenza e dimensione dei neonati, e un incremento dei neonati malformati (Cole, M. et al.,2015).

2. SCOPO DELLA TESI

Il presente lavoro di tesi s'inserisce in un contesto di crescente attenzione verso lo sviluppo di metodi di analisi quali-quantitative di microplastiche in matrici ambientali. Lo scopo principale è quello di mettere a punto un metodo basato sulla pirolisi analitica che permetta d'identificare e di quantificare il polistirene (PS) in tessuti biologici. La scelta di approfondire lo studio sulle particelle di PS nasce dal fatto che tra i polimeri plastici il PS è uno tra i più diffusi, in quanto ampiamente utilizzato come materiale d'imballaggio per alimenti e prodotti di consumo grazie al suo basso costo di produzione (Gesamp., 2015). Date le ingenti quantità di polistirene prodotto, sembrerebbe che l'apporto di queste particelle in ambiente acquatico sia superiore rispetto ad altri polimeri, rappresentando un potenziale pericolo per gli organismi marini. Infatti è noto che il PS in seguito ad un processo di degradazione rilascia oligomeri stirenici che possono interferire con il sistema endocrino degli organismi marini, anche se le loro attività sono ancora oggetto di studio (Saido, K., et al., 2014). La fase iniziale della tesi si è basata sulla pirolisi analitica off-line di PS standard. Nella pirolisi off-line i prodotti di pirolisi sono intrappolati e successivamente analizzati tramite gas cromatografia-spettrometria di massa (GC-MS). Sono stati testati due sistemi di campionamento: (1) microestrazione in fase solida (solid-phase microextraction, SPME) tramite fibra CAR/PDMS ed (2) estrazione in fase solida (solid-phase extraction, SPE) tramite cartucce adsorbenti ai carboni attivi. Il prodotto principale della pirolisi del PS, lo stirene, è stato utilizzato per quantificare il PS in tessuti biologici, utilizzando come riferimento campioni fortificati di tessuto muscolare di merluzzo comune (*Gadus morhua*). Inoltre è stato testato un protocollo di pretrattamento della matrice biologica prima di applicare la pirolisi analitica. Infine la procedura di quantificazione tramite cartuccia SPE è stata applicata per la determinazione del PS in tessuti di ghiandole digestive e branchie del mitilo mediterraneo (*Mytilus galloprovincialis*) proveniente da esperimenti riguardanti gli effetti ecotossicologici del PS.

3. PARTE SPERIMENTALE

MATERIALI E METODI

3.1. Materiali

- Filtri in quarzo (1.2 μm , diam. 47mm, type R-100) SKC inc.
- Microsiringa da 10 mL - MICRO-MATE[®]-cadence science, inc.
- Filtro per siringa con membrana in nylon (0.2 μm) e alloggiamento in polipropilene (diam. 25 mm) - Whatman[™]

3.1.1. Solventi

I solventi utilizzati sono stati impiegati per la pulizia della vetreria e per il trattamento dei campioni per le analisi.

- Acetone, Sigma-Aldrich ($\geq 99.5\%$ di purezza).
- Toluene, CHROMASOLV[®] for HPLC - Sigma-Aldrich ($\geq 99.9\%$, di purezza).

3.1.2. Polimeri standard

- PS standard granulare (M_w : 382.100) (Sigma-Aldrich).
- Microsfere di PS da 45 μm (PS45) fluorescente in soluzione acquosa al 2.5%. 4.99×10^5 particelle /mL (Polysciences, inc. Chemistry).
- Microsfere di PS da 3 μm (PS3) fluorescente in soluzione acquosa al 2.5 %. 1.68×10^9 particelle / mL (Polysciences, inc. Chemistry).

3.1.3. Soluzioni standard

- 1,3,5,-Tri-tert-butylbenzene (TTB) - Sigma-Aldrich, soluzione 1000 mg/L. La soluzione è stata ottenuta sciogliendo circa 2.00 mg esattamente pesati (± 0.01) di TTB in polvere, in 2 mL di toluene. Tale soluzione è stata impiegata come standard interno per il calcolo delle concentrazioni di PS nei tessuti biologici.
- PS standard granulare, in soluzione 53.4 g/L, diluito in Toluene. La soluzione stock, a 53.4 g/L è stata ottenuta sciogliendo 53.4 mg di PS standard granulare, in 1 mL di Toluene. Tale soluzione è stata diluita per

ottenere soluzioni a diverse concentrazioni minori, impiegate per il calcolo della curva di calibrazione.

3.1.4. Campioni di tessuto biologico

La fase sperimentale di questo studio è stata effettuata su tre tipologie di tessuti biologici contaminati da microplastiche di PS

- Tessuto muscolare di merluzzo comune (*Gadus morhua*)
- Ghiandole digestive di mitilo mediterraneo (*Mytilus galloprovincialis*)
- Branchie di mitilo mediterraneo (*Mytilus galloprovincialis*)

I tessuti muscolari del merluzzo comune sono stati contaminati in laboratorio con concentrazioni variabili di PS Standard granulare per la messa a punto del metodo. Le ghiandole digestive e le branchie del mitilo mediterraneo sono state fornite dal laboratorio di fisiologia e biochimica del Dipartimento di scienze biologiche, geologiche e ambientali (BiGeA) del Campus di Ravenna, già contaminate da microsferi di PS da 3 e 45 µm durante uno studio riguardante l'ecotossicità del PS che ha previsto l'esposizione in vivo del mitilo adulto a microsferi di PS.

3.1.5. Reagente per la digestione dei tessuti biologici

- Idrossido di Potassio (KOH) in pastiglie (Riedel-de Haen®).

Per la digestione dei tessuti biologici è stata utilizzata una soluzione acquosa al 10% di idrossido di potassio (KOH). La soluzione è stata ottenuta pesando ~ 1.05 g di KOH in pastiglie e portato ad un volume di 10 mL con acqua deionizzata in un matraccio da 10 mL.

3.1.6. Materiali per intrappolare i prodotti di pirolisi

- Fibra SPME (solid-phase micro extraction) – 75µm Carboxen/Polydimethylsiloxane(CAR/PDMS), Fused silica/SS 24Ga. Supelco
- Cartucce adsorbenti SPE (solid-phase extraction). ORBO™- 78. Carboxen® 564; Carbon Molecular Sieve (CMS) (400/200 mg) – 6mm x 110 mm Supelco.

3.2. Strumenti e metodi per le analisi

3.2.1. Metodo di digestione dei tessuti biologici

Le analisi per la messa a punto del metodo sono state effettuate su campioni di tessuto muscolare di merluzzo comune (*Gadus morhua*) (n=4) con peso medio di ~ 700 mg addizionato con una quantità nota (da un minimo di 1 mg ad un massimo di 32 mg) di PS standard puro (PS granulare). Il campione è stato trattato, in 10 mL di soluzione acquosa al 10% di KOH all'interno di un pallone da 50 mL, dotato di ancoretta magnetica, per 4 ore ad una temperatura di 90 °C. A digestione avvenuta il campione è stato sottoposto ad una procedura di estrazione con toluene. Per determinare l'efficacia del metodo digestivo diversi campioni (n=9) delle tre tipologie di tessuto biologico sono stati sottoposti ad una procedura di filtrazione. Entrambe le procedure sono descritte dettagliatamente nei successivi paragrafi.

3.2.2. Procedura di filtrazione ed efficienze di digestione

La verifica dell'efficacia di digestione del metodo è stata effettuata tramite la filtrazione della soluzione digerita con filtri in quarzo (1.2 µm, diam 47mm, type R-100). I filtri in quarzo sono stati essiccati su piastra riscaldante alla temperatura di 105°C per 60 minuti e pesati prima e dopo la filtrazione. Le efficienze di digestione sono state calcolate come segue, dove % De corrisponde all'efficienza di digestione, DW_f e DW_{fad} corrispondono rispettivamente al peso a secco del filtro prima e dopo la filtrazione del digestato. Infine, T_w corrisponde al peso dei tessuti sottoposti a digestione. (Dehaut, A. et al.,2016)

$$\%De = 100 - \left(\frac{DW_{fad} - DW_f}{T_w} \times 100 \right)$$

3.2.3. Procedura di estrazione a riflusso del polistirene

Alla soluzione acquosa da 10 mL contenente il campione digerito sono stati aggiunti 10 mL di toluene, in un pallone da 50mL a fondo sferico; il pallone è stato agganciato ad un tubo refrigerante a bolle e messo a riflusso per 60 minuti a 90°C. Successivamente la miscela proveniente dall'estrazione è stata travasata in

imbuto separatore per permettere la separazione della soluzione organica da quella acquosa. La soluzione organica è stata raccolta in un pallone a pera da 50 mL. La soluzione acquosa è stata estratta con altri 2.5 mL di toluene. La soluzione ottenuta è stata quindi concentrata in rotavapor a 90°C sino ad un volume finale di circa 1 mL e travasata all'interno di un vial da 4mL.

3.2.4. Pirolisi analitica: off – line

Le pirolisi sono state condotte su 5 µL della soluzione organica (trattamento descritto al paragrafo 3.2.3) e 5 µL di standard interno (TTB) in soluzione di toluene alla concentrazione di 1000 mg/L, direttamente iniettati tramite una microsiringa da 10 µL sulla lana di quarzo presente all'interno del tubicino portacampioni. Il tubicino portacampioni è stato inserito nella sonda pirolitica, e isolato dall'ambiente esterno tramite la camera di pirolisi con flusso variabile di N₂ in base alla tipologia di trappola utilizzata, 40 mL/min nel caso della fibra SPME (CAR/PDMS) e 100 mL/min nel caso della cartuccia adsorbente SPE. Il tubicino è stato riscaldato a 100°C per 100 secondi per eliminare il solvente (la procedura è stata eseguita 2 volte). I campioni sono stati pirolizzati a ~ 500 °C (set 700°C) per 100 secondi alla massima velocità di riscaldamento. Prima di ogni pirolisi è stato effettuato un trattamento di clean del portacampioni in quarzo alla temperatura di ~1200 °C per 5 secondi ed un accurato lavaggio della camera di pirolisi con acetone e acqua deionizzata.

Per gli esperimenti in pirolisi analitica è stato utilizzato un pirolizzatore a filamento CDS Pyroprobe 1000, dotato di una consolle da cui è possibile impostare i parametri strumentali (rampa termica, temperatura, tempo di pirolisi), una sonda recante il filamento a serpentina in platino entro cui viene posto un tubicino porta campione in quarzo e di una camera di pirolisi in vetro (Fig. 3.1). La camera di pirolisi è dotata di tre aperture: una per l'introduzione del gas inerte (azoto - N₂), una per l'inserimento della sonda con filamento di platino contenente il campione ed infine una per l'uscita dei prodotti di pirolisi trascinati dal flusso di gas inerte e diretti verso il sistema di intrappolamento. Avviata la fase di pirolisi il filamento scaldandosi per induzione elettrica trasmette calore al campione determinandone la degradazione termica. Il pirolizzatore può operare a temperature pre-impostabili che variano tra i 300 e i 1200 °C. Questo tipo di pirolisi non prevede un sistema

d'interfaccia GC-MS, ma una raccolta dei prodotti di pirolisi tramite apposite trappole, che vengono successivamente analizzate in GC-MS. Nel presente studio sono stati utilizzati due differenti tipi di campionamento.

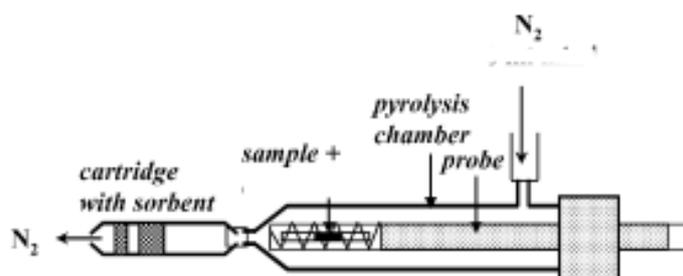


Figura 3.1: schema del piroizzatore analitico. Fonte: modificato da Fabbri D. et al., 2006

3.2.5. Campionamento dei prodotti di pirolisi

➤ Fibra SPME (CAR/PDMS- 75 μ m - Supelco) sostenuta tramite un braccio metallico al di sopra della camera di pirolisi ed estratta all'interno di essa in modo da intrappolare i prodotti di pirolisi gassosi.

➤ Cartuccia adsorbente SPE (ORBOTM- 78. Carboxen[®] 564. Supelco) direttamente collegata alla terza uscita della camera di pirolisi tramite un giunto in silicone. Prima di effettuare l'analisi in GC-MS, i carboni delle cartucce adsorbenti SPE sono stati travasati in un vial da 4 mL a cui è stato aggiunto 1mL di toluene e messo in agitazione con un rotatore meccanico per un'ora a temperatura ambiente. Successivamente l'estratto in toluene è stato trasferito in un vial da 1.7 mL tramite l'uso di una microsiringa da 10 mL (MICRO-MATE[®]-cadence science, inc.) dotata di filtro con membrana in nylon (0.2 μ m- diam.25mm - WhatmanTM).

3.2.6. GC-MS

Le determinazioni qualitative e quantitative sono state eseguite con due differenti sistemi di GC-MS in base al tipo di trappola usata durante la pirolisi:

➤ GC-MS dei prodotti di pirolisi adsorbiti su fibra SPME (CAR/PDMS)

Per la determinazione dei prodotti di pirolisi adsorbiti su fibra SPME è stato usato un Gas cromatografo Agilent 6850 interfacciato ad uno spettrometro di massa a quadrupolo Agilent 5975, con elio fase mobile a 1 mL/min e con colonna 5% fenile e 95% metile polisilossano (Agilent HP-5MS, 30 m, 0.25 mm, 0.25 μ m film). La

temperatura dell'iniettore è stata impostata a 260 °C in modalità splitless. La programmata termica usata è stata di 50 °C per 5 minuti, rampa termica di 10 °C/min fino a 325 °C, 325°C per 10 minuti per totale di analisi di 42.5 minuti. La rivelazione MS è stata fatta con ionizzazione elettronica (EI) a 70 eV, acquisendo il segnale in full scan nell'intervallo di massa 30-650 m/z per l'analisi dei principali prodotti di degradazione termica del polistirene.

➤ GC-MS dei prodotti di pirolisi adsorbiti su cartuccia SPE

Le analisi sono state eseguite con un sistema Shimadzu GCMS-QP2010 (Shimadzu, kyoto, Giappone), con elio fase mobile mantenuto ad una velocità lineare costante di 35 cm/sec e con colonna 5% fenile e 95% dimetile polisilossano (ZB-35, 30 m, 0.25 mm, 0.25 µm film). La temperatura dell'iniettore è stata impostata a 280°C in modalità splitless. La programmata termica usata è stata di 50 °C iniziale, aumentata di 5 °C/min fino a 100 °C, e successivamente di 10°C/min fino a 290 °C mantenuta per 1 minuto per totale di analisi di 30 min. La durata del solvent-delay è stata di 5.50 min. La rivelazione MS è stata fatta con ionizzazione elettronica (EI) a 70 eV, acquisendo il segnale in full scan nell'intervallo di massa 40-350 m/z per l'analisi dei principali prodotti di degradazione termica del polistirene. La procedura di analisi in GC-MS delle cartucce adsorbenti SPE è stata scelta come procedura definitiva per la quantificazione delle microplastiche di polistirene in tessuti biologici. Per l'analisi quantitativa del PS l'acquisizione è stata effettuata invece in ione selezionato (single ion monitoring, SIM), utilizzando gli ioni principali dell'analita. Il rivelatore selettivo di massa è stato impostato in modo da acquisire le seguenti masse:

Tempo (min)	m/z
5.50 – 15.00	104 - 78
17.00 – 24.00	208 - 91
24.00 – 30.00	207 - 91

All'inizio della fase di ottimizzazione del metodo, per stabilire i tempi di ritenzione

dei tre principali prodotti di degradazione, sono stati analizzati 5 µL di soluzione standard di calibrazione (alle diverse concentrazioni descritte nel paragrafo 3.2.8) + 5 µL 1000 mg/L di standard interno in soluzione di toluene, registrando la corrente ionica nell'intervallo di massa 40-350 m/z (metodo TIC: Total Ionic Current). Oltre ai tempi di ritenzione del picco cromatografico dei singoli composti, sono state determinate le masse caratteristiche dei frammenti ionici ed i loro rapporti per utilizzarli successivamente nel metodo SIM. L'acquisizione in SIM ha consentito di registrare la corrente ionica dovuta a singole masse in finestre di tempo stabilite.

3.2.7. Analisi qualitativa

L'identificazione del PS nei campioni ambientali è avvenuta per confronto degli spettri di massa ottenuti dalle analisi, con gli spettri di massa di composti puri (Standard di PS) tenendo in considerazione i tre principali prodotti di degradazione termica:

- Stirene (monomero)
- 2,4-difenil-1-butene (dimero)
- 2,4,6- trifenil-1-esene (trimero).

Gli standard di PS puro utilizzati per la qualitativa sono i seguenti:

- PS granulare
- PS in soluzione acquosa (3 µm)
- PS in soluzione acquosa (45 µm)

Il PS granulare è stato posto a Pirolisi analitica: off – line e analizzato in GC-MS sia tal quale (0.5 mg) che disciolto in toluene. Invece, i PS in soluzione acquosa (3-45 µm) sono stati disciolti in toluene, previa evaporazione dell'acqua, e pirolizzati tramite pirolisi analitica: off- line e analizzati in GC-MS.

3.2.8. Calibrazione

Le soluzioni standard di calibrazione sono state preparate mediante la diluizione della soluzione stock 53.4 g/L. In particolare sono state preparate 6 soluzioni di calibrazione alle concentrazioni di 26.7 – 16.0 – 10.7 – 5.34 – 2.67 – 0.27 g/L, e allo stesso volume di 1mL. Ai 5 µL di soluzione di calibrazione sono stati aggiunti 5 µL di soluzione di standard interno 1000 mg/L e si è proceduto alla pirolisi come descritto in paragrafo 3.2.4. L'analisi GC-MS delle soluzioni di calibrazione è stata

effettuata su entrambe le tipologie di trappole utilizzate. Con la fibra SPME calibrazione a 6 punti con limite inferiore pari a 13.4 µg di PS e limite superiore pari a 267 µg di PS; mentre con la cartuccia SPE calibrazione a 4 punti con il limite inferiore ridotto fino a 1.33 µg e un limite superiore pari 133 µg di PS.

3.2.9. Recupero

Per recupero s'intende la capacità di un metodo analitico di determinare la totalità dell'analita presente in una matrice. Per verificare l'efficacia di estrazione del polistirene dai tessuti biologici si sono determinati i recuperi di campioni fortificati di tessuto muscolare di merluzzo comune addizionati con quantità note di polistirene standard granulare, utilizzando come standard interno il TTB. Il recupero è stato calcolato con la seguente formula:

$$\% R = \left(\frac{Q_{stm}}{Q_{sta}} \right) * 100$$

Dove Q_{sta} è la quantità di standard aggiunto e Q_{stm} è la quantità di standard misurato.

3.2.10. Bianco procedurale e analisi campioni di controllo

Per determinare la presenza eventuale di interferenti e principali prodotti di degradazione del PS non derivanti dalla pirolisi dei campioni contaminati, sono stati eseguiti dei bianchi procedurali e delle analisi su campioni di controllo. Il bianco procedurale consiste nell'applicazione dell'intera procedura compresa una prova di pirolisi standard in assenza del campione. L'analisi del campione di controllo consiste nell'applicazione dell'intera procedura compresa una prova di pirolisi standard con un campione non contaminato.

3.3. Verifica della procedura di quantificazione su campioni reali

L'intera procedura di quantificazione delle microplastiche di PS nei tessuti biologici con le cartucce SPE è stata verificata su campioni compositi (4 tessuti per analisi) di ghiandole digestive e branchie del mitilo mediterraneo esposti in vivo a microparticelle di PS da 3 e 45 µm alle diverse concentrazioni di 1.50 µg/L, 150 ng/L e 15.0 ng/L per le PS3 e di 2.25 µg/L, 225 ng/L e 22.5 ng/L per le PS45, in vasche da 10L contenenti 10 individui per vasca per un periodo di esposizione di 4 giorni; ogni 24 ore le vasche sono state svuotate e ripristinate con le stesse

concentrazione (Studio condotto dalla Dott.ssa Franzellitti, S. del Laboratorio di fisiologia e biochimica del Dip. BiGeA). È stato possibile quindi stimare le quantità assolute di polimero con cui le vasche sono state trattate nell'intero periodo di esposizione. Tale quantità corrisponde a 60 µg, 6.0 µg e 0.60 µg per le microparticelle da 3 µm e a 90 µg, 9.0 µg e 0.90 µg per quelle da 45 µm. Date le basse concentrazioni potenzialmente riscontrabili nei tessuti è stata apportata una modifica rispetto alla procedura di quantificazione applicata per la messa a punto del metodo. Mentre la messa a punto del metodo, ha previsto la pirolisi di 5 µL di estratto in toluene (procedura descritta al paragrafo 3.2.4), in questo caso si è proceduto inserendo un'aliquota di ~ 15.0 mg di lana di quarzo, tipicamente usata per la pirolisi, all'interno del pallone, contenente l'estratto in toluene, portandolo a completa essiccazione in rotavapor e successivamente pirolizzando la lana di quarzo. Questa modifica è stata effettuata al fine di pirolizzare tutto il PS estratto con toluene, e non solo un'aliquota.

4. RISULTATI E DISCUSSIONE

4.1. Valutazione del metodo di digestione dei tessuti biologici

Finora, quattro principali metodi sono stati descritti in letteratura per digerire i materiali organici ed estrarre microplastiche dai tessuti biologici; in particolare vengono descritti metodi con reagenti acidi (Van Cauwenberghe e Janssen, 2014; Van Cauwenberghe et al., 2015a; Claessens, M. et al., 2013), alcalini (Dehaut, A. et al., 2016; Karami, A., et al., 2017), ossidativi (Nuelle, M. T. et al., 2014; Avio, C. G., 2015) ed enzimatici (Fischer, M., & Scholz-Böttcher, B. M. 2017; Cole, M. et al., 2014). Tuttavia, la maggior parte di questi metodi non sono adatti per il monitoraggio su larga scala, poiché richiedono tempo o sono troppo costosi per essere implementati. Di conseguenza, non soddisfano esattamente le richieste di alcuni organismi internazionali, come OSPAR (Oslo/Paris convention - for the Protection of the Marine Environment of the North-East Atlantic) o la direttiva quadro sulla strategia marina (MSFD), per fornire metodi analitici standard, efficaci ed economici (OSPAR, 2015). Le problematiche principali spesso risiedono nella scarsa efficienza nel digerire i tessuti biologici e nei danni che possono essere osservati sulla plastica dopo i processi di digestione e di estrazione. Ad esempio, la maggior parte dei documenti pubblicati, così come le raccomandazioni di OSPAR, utilizzano protocolli contenenti acido nitrico (HNO_3) per digerire i tessuti biologici, nonostante le segnalazioni di degradazione sostanziale di polistirene (OSPAR, 2015; Avio, C. G., 2015; Dehaut, A. et al., 2016). Ciò potrebbe portare a sottostimare concentrazioni e quantità di microplastiche e interpretazioni erranee dei livelli effettivi di contaminazione negli organismi marini.

Nel presente lavoro di tesi per digerire le 3 tipologie di tessuti biologici e garantire l'integrità del polistirene è stato impiegato un metodo adattato e ottimizzato in base ad un protocollo di digestione già adoperato in uno studio condotto da Dehaut, A et al. (2016), apportando delle modifiche per quanto riguarda, il volume della soluzione, il tempo d'incubazione e la temperatura; al fine di rendere tale metodo adatto alle analisi di routine. Il metodo consiste nella digestione alcalina con una soluzione acquosa al 10% di KOH per 4 ore a 90°C. Tale metodo, applicato su 3 campioni per tipologia di tessuto biologico per un totale di 9 campioni mostra buoni risultati garantendo un'efficiente digestione della sostanza organica. L'utilizzo di KOH, infatti, ha portato ad una buona digestione dei tessuti organici, in quanto il

digestato non presentava particelle organiche visibili ad occhio nudo. Queste osservazioni sui filtri sono state confermate dalle valutazioni di efficienza della digestione. La figura 4.1 mostra i risultati ottenuti dall'applicazione del metodo di digestione su 3 tipologie di tessuti biologici (sono stati trattati ~500 mg di tessuto umido). La figura riporta la % di efficienza di digestione indicata come %De. Com'è possibile osservare i 3 campioni di ghiandole digestive (GH) del mitilo mediterraneo mostrano una %De tra il 96.3 e 98.3%, i 3 campioni di tessuto muscolare (TM) di merluzzo comune mostrano una %De tra il 96.2 e il 97.9 % e i 3 campioni di branchie (BR) del mitilo mediterraneo mostrano una %De tra il 97.4 e 99.6%. Inoltre, è possibile notare una maggiore efficacia di digestione per le branchie rispetto agli altri due tessuti biologici. Confrontando i risultati con quelli ottenuti da Dehaut, A et al. (2016) (%De tra il 99.6 e 99.8%) si possono notare delle leggere differenze probabilmente dovute ad una riduzione sostanziale del tempo d'incubazione e ad un aumento delle temperature (Dehaut, A et al.2016: 60°C per 24h; presente studio: 90°C per 4h). Anche se si riscontra un leggero peggioramento dell'efficienze di digestione si ritiene comunque che si tratti di efficienze di digestione elevate e in accordo con i dati presenti in letteratura (Dehaut, A. et al.,2016). Inoltre, i buoni risultati ottenuti e le tempistiche relativamente brevi del metodo suggeriscono l'applicabilità della procedura per le analisi di routine.

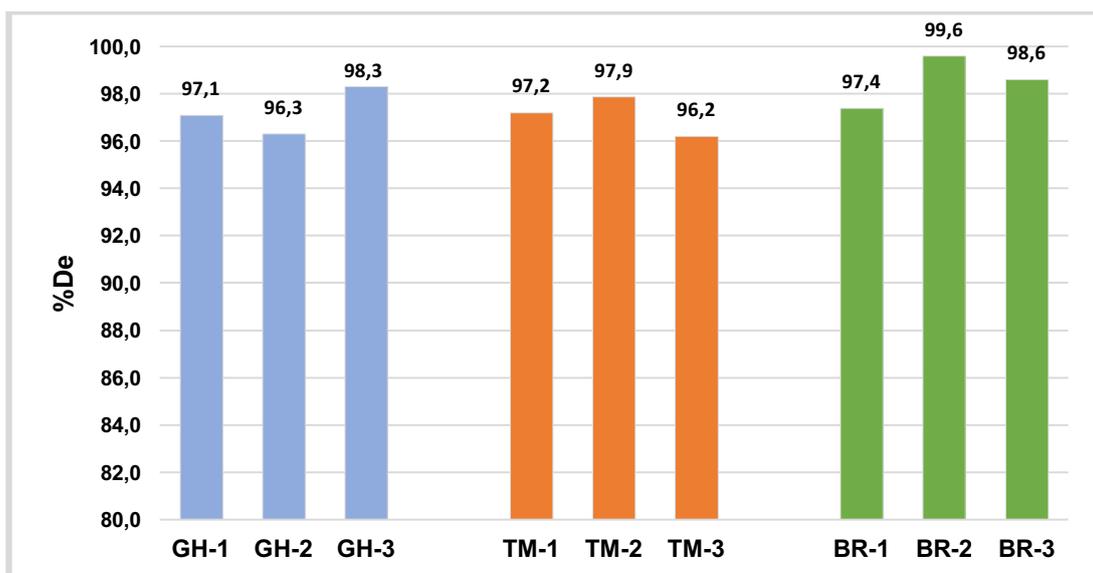


Figura 4.1: Istogramma che rappresenta le efficienze di digestione delle tre tipologie di tessuti biologici sottoposti a digestione in soluzione al 10% di $KOH_{(aq)}$. In Blu sono rappresentati i 3 campioni di Ghiandole digestive del mitilo mediterraneo, in arancione i tessuti muscolari di merluzzo comune e in verde le branchie del mitilo mediterraneo.

4.2. Pirolisi analitica off - line del polistirene

La pirolisi analitica è una tra le tecniche utilizzate per le analisi delle microplastiche nelle diverse matrici ambientali (Fabbri, D., 2001; Fabbri, D. et al. 1998; Fries, E. et al., 2013; Kusch, P. 2012). A differenza di altre tecniche termiche, utilizzate con il medesimo scopo, come ad esempio la termogravimetria o la calorimetria differenziale a scansione (DSC), la pirolisi analitica permette di separare ed identificare i prodotti di degradazione termica caratteristici di ogni polimero tramite gas cromatografia-spettrometria di massa (GC-MS). Infatti, la degradazione termica di molti polimeri sintetici avviene nello stesso intervallo di temperatura (~ 350 - 450 ° C) (Dümichen E. et al.,2015), per cui l'identificazione del polimero richiede l'utilizzo di metodi specifici. Altro vantaggio della pirolisi analitica è dato dalla possibilità di trattare campioni con masse molto piccole (< 0.5 mg). In questo studio è stata applicata la pirolisi analitica, con filamento a serpentina in platino riscaldato, nella configurazione off-line, per la determinazione del polistirene (PS) in tessuti biologici. Le pirolisi sono state condotte a ~500 °C, temperatura sufficientemente alta da garantire la degradazione termica del PS. Infatti il PS presenta una temperatura di degradazione a partire da ~ 350°C. (Westerhout, R.W.J. et al. 1997; Wünsch, J. R. 2000; Dümichen E. et al. 2017;). I relativi prodotti di pirolisi sono stati campionati tramite apposite trappole ed in seguito analizzati in GC-MS. Sono state considerate due tecniche di campionamento dei prodotti di pirolisi: (1) estrazione in fase solida (SPE) tramite cartucce adsorbenti ai carboni attivi e (2) microestrazione in fase solida (SPME) tramite fibra CAR/PDMS. La prima fase dello studio ha previsto l'analisi di campioni di PS standard tal quale (0.5 mg) ed in soluzione di toluene con lo scopo di valutare il comportamento del PS pirolizzato in diverse condizioni per verificare la possibilità di identificare i prodotti di pirolisi caratteristici. La seconda fase dello studio ha riguardato la quantificazione di PS in campioni fortificati tramite l'analisi di entrambe le trappole. Infine la procedura di quantificazione tramite cartucce adsorbenti SPE, scelta come procedura definitiva, è stata applicata a campioni reali provenienti da esperimenti di ecotossicità in acquario.

4.2.1. Analisi qualitativa del polistirene solido

Un campione di PS solido granulare (tal quale) è stato pirolizzato tramite pirolisi analitica nella configurazione off-line. I prodotti di degradazione sono stati campionati tramite fibra SPME ed analizzati in GC-MS al fine di indentificare i principali prodotti di pirolisi. Il cromatogramma ottenuto dalla pirolisi del polistirene è raffigurato in figura 4.2. In figura sono stati numerati i principali prodotti di pirolisi, la cui identificazione è riportata in tabella 4.1.

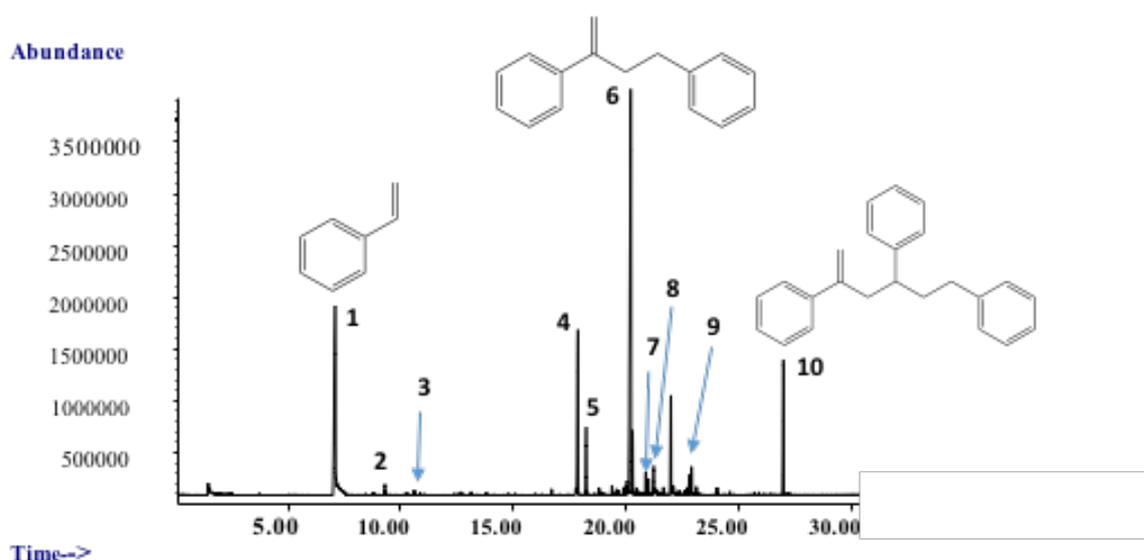


Figura 4.2: cromatogramma in corrente ionica totale (TIC) ottenuto dalla pirolisi di PS granulare con SPME. I numeri sui picchi si riferiscono ai composti della tabella 4.1.

#	COMPOSTO	M/Z
1	Stirene (monomero)	78-104
2	α-metilstirene	103-118
3	2-fenilpropanale	77-103
4	Dibenzile	91-182
5	α-metildibenzile	91-105
6	2,4-difenil-1-butene(dimero)	91-208
7	1,3-difenil-1-butene	115-208
8	1,4 difenil-1,3 butadiene	91-206
9	2-fenilnaftalene	101-204
10	2,4,6- trifenil-1-esene (trimero)	91-207
11	TTB (standard interno)	231

Tabella 4.1: Principali prodotti identificati nei cromatogrammi ottenuti da pirolisi analitica off – line e successiva analisi in GC-MS di PS.

Dal cromatogramma è possibile osservare che i picchi più abbondanti rappresentano i principali composti identificativi del PS, ovvero stirene (monomero), 2,4-difenil-1-butene (dimero), 2,4,6- trifenil-1-esene (trimero) i cui spettri di massa sono riportati in figura 4.3.

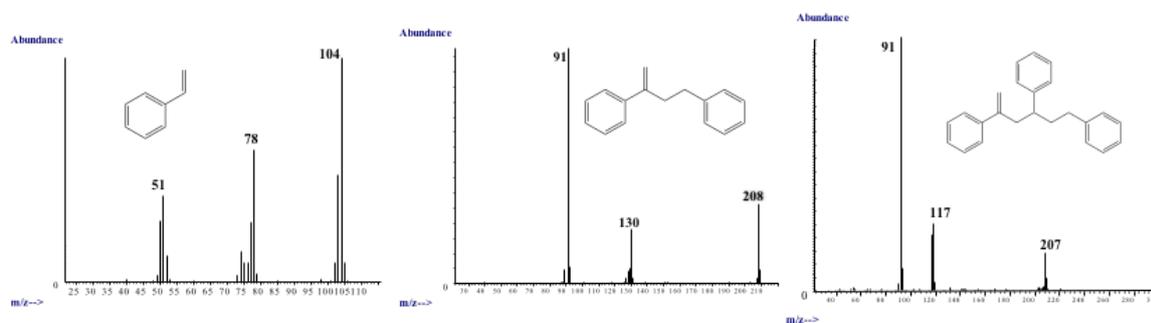


Figura 4.3: Spettri di massa dei 3 principali prodotti di pirolisi del PS.

Inoltre in tabella 4.1 sono riportati altri composti tipici della degradazione termica del PS, quali: α -metilstirene, dibenzile, α -metildibenzile, 2-fenilnaftalene. L'identificazione di tali composti come prodotti di degradazione termica del PS è in accordo con i dati presenti in letteratura (Fabbri, D. et al., 1998; Fabbri, D. et al., 2001; Kusch, P., & Knupp, G., 2004; Dümichen, E. et al., 2017).

4.2.2. Analisi qualitativa del polistirene disciolto in toluene

I campioni delle tre tipologie di PS standard (3 μm , 45 μm e granulare) disciolti in toluene sono stati pirolizzati tramite pirolisi analitica off-line, previa evaporazione del toluene con un trattamento termico a 100 °C. I prodotti di degradazione sono stati campionati tramite fibra SPME e cartuccia SPE e successivamente analizzati in GC-MS al fine di indentificare i principali prodotti di pirolisi e di effettuare un confronto con il cromatogramma del PS analizzato tal quale. In figura 4.4 e 4.5 sono riportati i cromatogrammi delle analisi in GC-MS dei campioni di PS granulare, 3 μm e 45 μm in toluene ottenuti rispettivamente con la fibra SPME e cartuccia SPE.

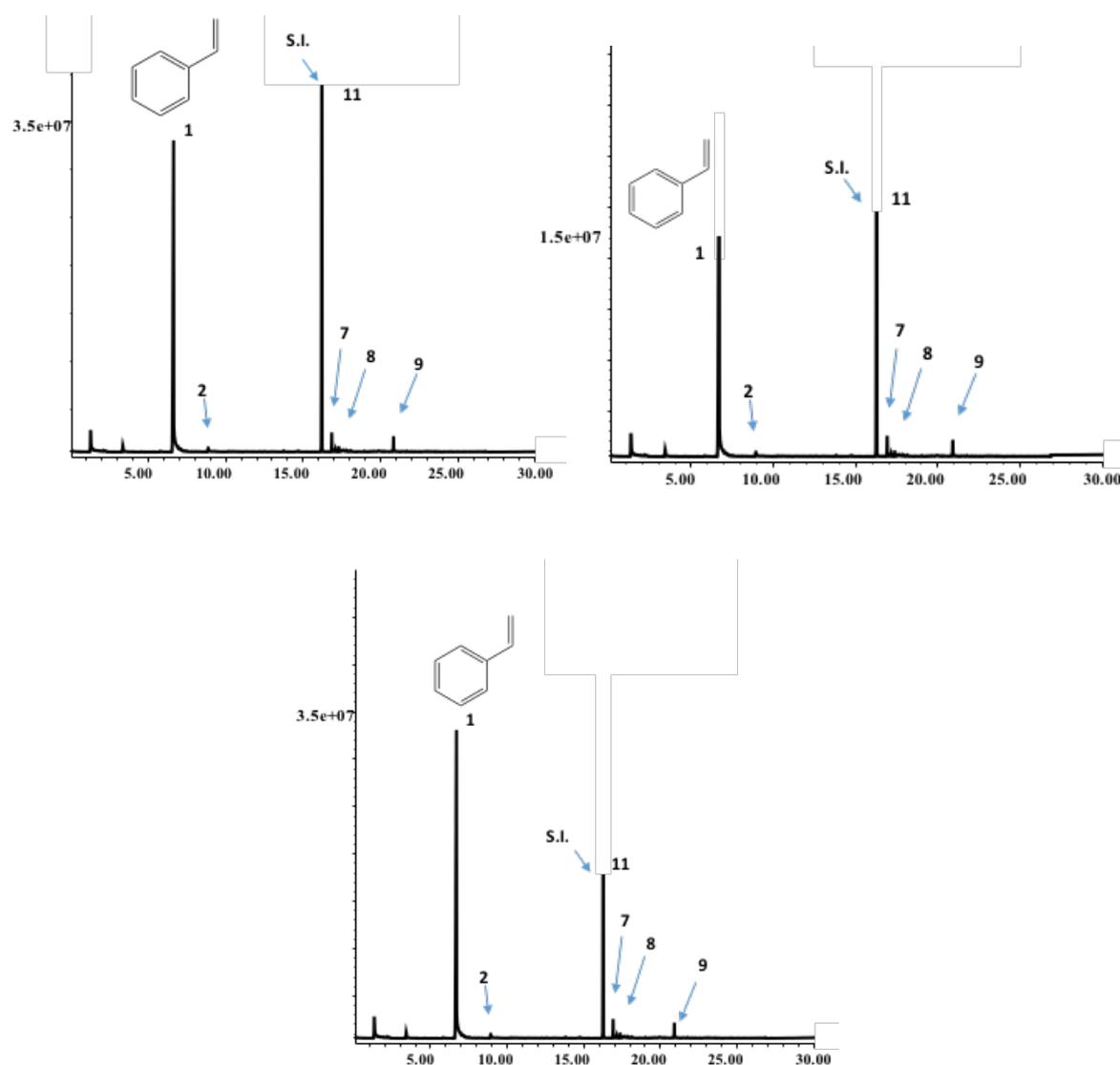
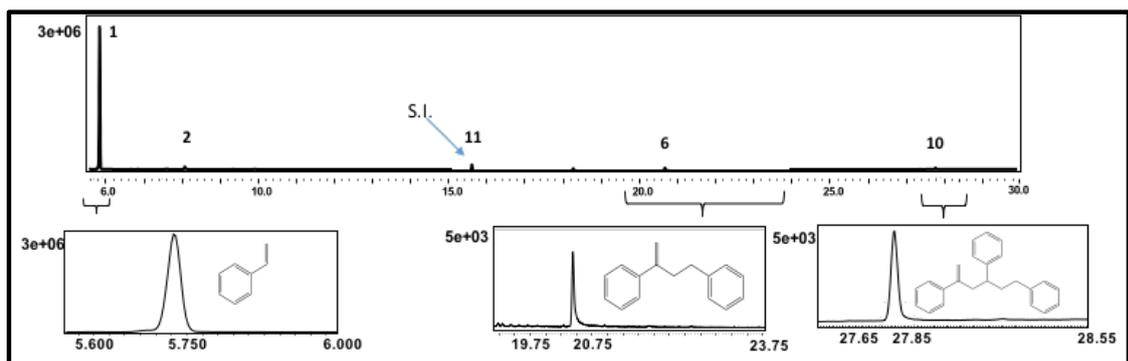
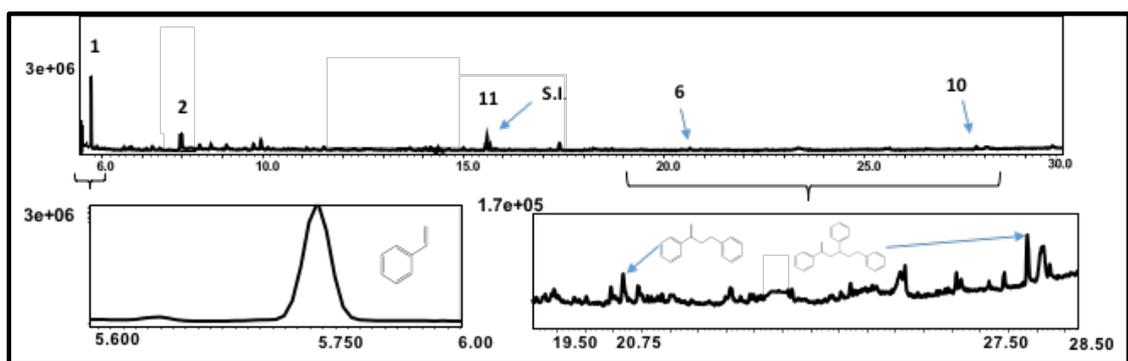


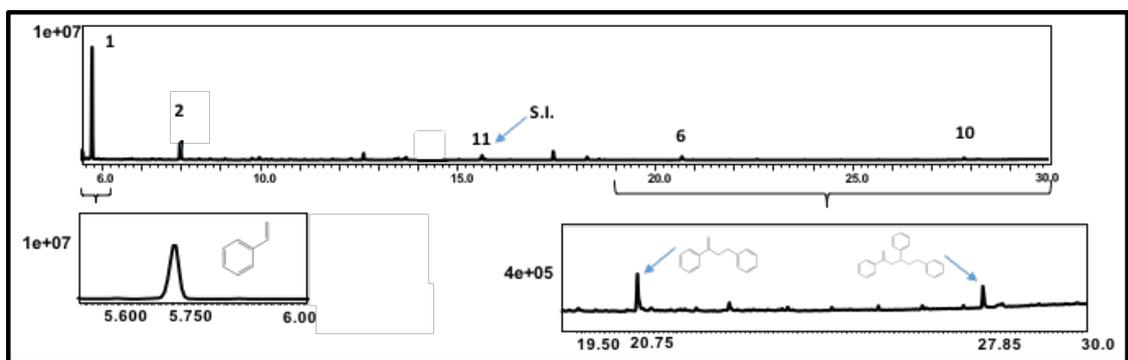
Figura 4.4: Cromatogrammi ottenuti da analisi GC-MS su fibra SPME dalla pirolisi di soluzione di PS standard in toluene. In alto, da sinistra PS granulare e PS 3 μm , in basso PS 45 μm . I numeri sui picchi si riferiscono alla tabella 4.1



PS-granulare



PS 3µm



PS 45µm

Figura 4.5: Cromatogrammi ottenuti da analisi GC-MS su cartuccia SPE di campioni di soluzione di PS standard in toluene. Dall' alto sono mostrati rispettivamente il PS granulare, PS 3µm e PS 45 µm. I numeri sui picchi si riferiscono alla tabella 4.1

Com'è possibile osservare dalle figure 4.4 e 4.5 i cromatogrammi delle tre tipologie di PS standard sia per la fibra SPME che per la cartuccia SPE, sono molto simili tra loro. Questo indica che non esistono differenze nei prodotti di degradazione tra le diverse tipologie di PS e quindi una determinata identificazione può essere effettuata indipendentemente dal tipo di PS pirolizzato. Dümichen E. et al. (2015-2017), in due studi mirati alla determinazione di microplastiche in campioni ambientali utilizzando un metodo di degradazione termica (TED-GC-MS),

affermano che i più comuni polimeri termoplastici si degradano allo stesso modo indipendentemente dalla loro dimensione, morfologia e struttura delle particelle. Tuttavia, i cromatogrammi delle analisi effettuate su PS, dopo dissoluzione in toluene e deposizione su lana di quarzo nel tubo di pirolisi, con fibra SPME (fig. 4.4) nonostante mostrino un'abbondanza di stirene (#1) comparabile con il cromatogramma del PS pirolizzato tal quale (fig. 4.2) non sono stati rivelati né lo stirene dimero (#6), né lo stirene trimero (#10). Inoltre tra gli altri composti tipici derivanti dalla degradazione termica del PS sono stati osservati: α -metilstirene (#2), 1,3-difenil-1-butene (#7), 1,4 difenil-1,3 butadiene (#8) e il 2-fenilnaftalene (#9). Per quanto concerne i cromatogrammi ottenuti dalle analisi GC-MS su cartuccia SPE (fig. 4.5), mostrano anch'essi un'abbondanza di stirene (#1) comparabile con il cromatogramma del PS pirolizzato tal quale e con i cromatogrammi del PS in toluene ottenuti tramite fibra SPME (fig. 4.4). Le abbondanze dello stirene dimero (#6) e dello stirene trimero (#10), anche se rivelabili risultano molto basse. Mentre tra gli altri composti tipici della pirolisi del PS, l'unico composto osservato, a differenza quelli osservati nel PS tal quale, è stato α -metilstirene (#2). La non rivelazione del dimero e del trimero nel caso del PS in toluene campionati con fibra SPME o la loro bassa abbondanza nel caso della cartuccia SPE così come le differenze di rivelazione tra gli altri prodotti di pirolisi potrebbero essere attribuite all'utilizzo del solvente. Il toluene viene evaporato con un trattamento termico a 100 °C prima della pirolisi (effettuata a ~500 °C), la dispersione del PS nel tubo di quarzo in seguito all'eliminazione del solvente potrebbe modificare il comportamento pirolitico rispetto al polimero granulare, ad esempio per interazione con la superficie del quarzo.

4.3. Analisi quantitativa

4.3.1. Calibrazione

Il protocollo di calibrazione consiste nella produzione di soluzioni di calibrazione contenenti quantità variabili di analita standard e la stessa quantità di standard interno. Il modello di calibrazione lineare è stato ottenuto con il metodo dei minimi quadrati, ed è espresso dall'equazione $Y = aX + b$, in cui Y è il rapporto delle aree dei picchi cromatografici del monomero del PS (stirene) e dello standard interno (TTB), ottenute dall'analisi GC-MS, e X la massa dell'analita direttamente pirolizzato.

4.3.2. Calibrazione con fibra SPME

La determinazione dei prodotti di pirolisi adsorbiti su fibra SPME, è stata effettuata acquisendo il segnale in full scan determinando l'area dei picchi dello stirene e dello standard interno (TTB) su ioni selezionati m/z 104 (stirene) e m/z 231 (TTB). Sono state effettuate le analisi GC-MS di 5 µL delle soluzioni di calibrazione alle concentrazioni di 53.4 – 26.7 – 16.0 – 10.7 – 5.34 – 2.67 g/L di PS in toluene (per ogni analisi sono stati aggiunti 5 µL di soluzione in toluene di standard interno alla concentrazione di 1000 mg/L), determinando la linearità di risposta del rapporto tra le aree dello stirene e le aree dello standard interno in funzione della quantità di PS. I risultati ottenuti mostrano un andamento lineare di risposta rispetto alla quantità nell'intervallo 13.4 – 267 µg di PS pirolizzato ($R^2 = 0.990$). I risultati sono mostrati in figura 4.6.

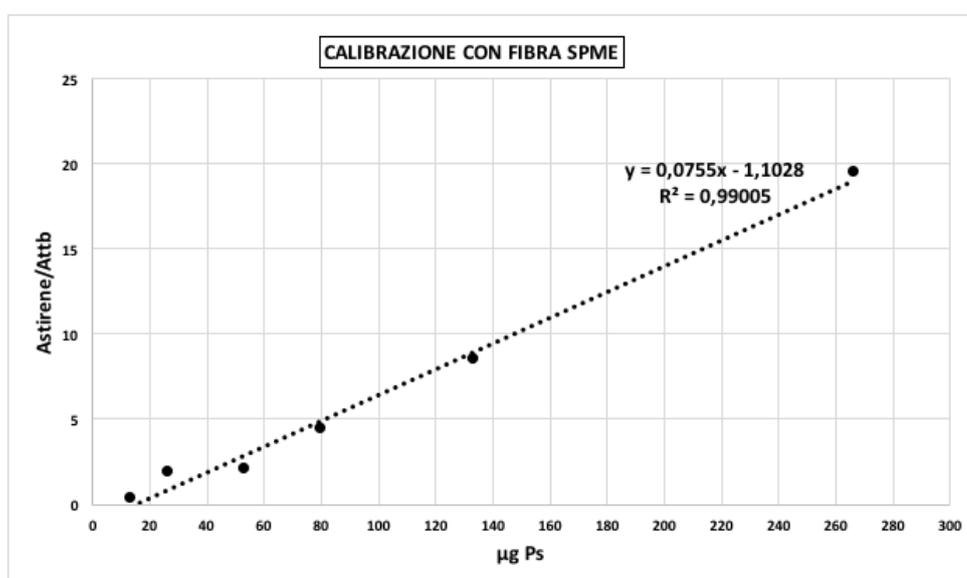


Figura 4.6: Curva di calibrazione della analisi GC-MS del pirolizzato di polistirene granulare campionato con fibra SPME.

4.3.3. Calibrazione con cartuccia SPE

La determinazione dei prodotti di pirolisi adsorbiti su cartuccia SPE, è stata effettuata acquisendo il segnale in SIM (single ion monitoring), utilizzando lo ione principale dello stirene (m/z 104) e il picco base dello standard interno (TTB, m/z 231). Sono state effettuate le analisi GC-MS di 5 µL delle soluzioni di calibrazione alle concentrazioni di 26.7 – 10.7– 2.67 – 0.27 g/L di PS in toluene (per ogni analisi sono stati aggiunti 5 µL di soluzione in toluene di standard interno, alla concentrazione di 1000 mg/L), determinando la linearità di risposta del rapporto tra le aree dello stirene e le aree dello standard interno in funzione della quantità di PS. I risultati ottenuti mostrano un andamento lineare di risposta rispetto alla quantità nell'intervallo 1.33 – 133 µg di PS ($R^2 = 0.985$). I risultati sono mostrati in figura 4.7.

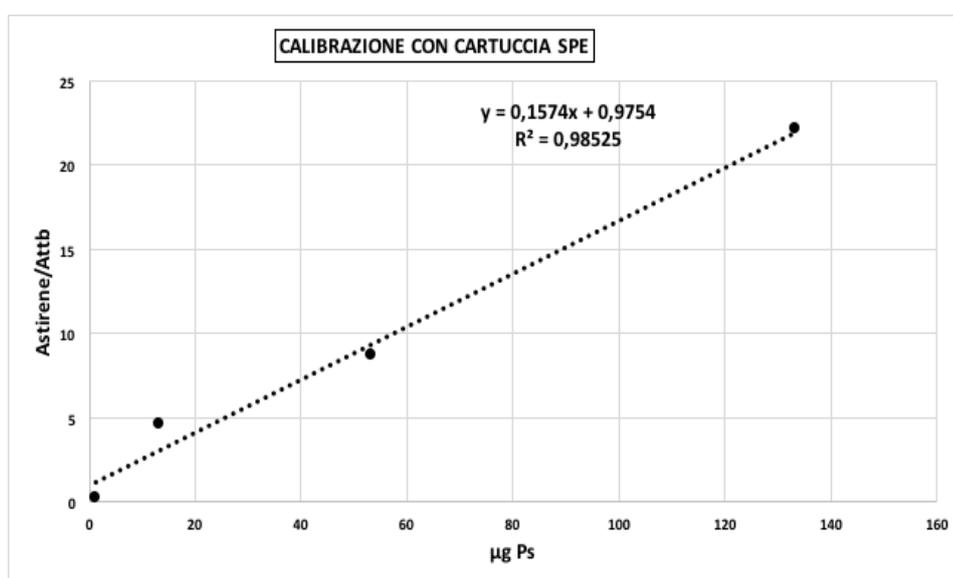


Figura 4.7: Calibrazione della analisi GC-MS del pirolizzato di polistirene granulare campionato con cartuccia SPE

Per le analisi dei campioni reali descritte al paragrafo 4.5, dato che le quantità di polistirene riscontrate in 5 campioni su un totale di 12, si posizionavano al di sotto del limite di massa inferiore dell'intervallo di calibrazione, si è applicata una modifica alla curva di calibrazione impostando l'intercetta passante per l'origine. L'andamento lineare di risposta mostra un $R^2 = 0.978$. I risultati sono mostrati in figura 4.8.

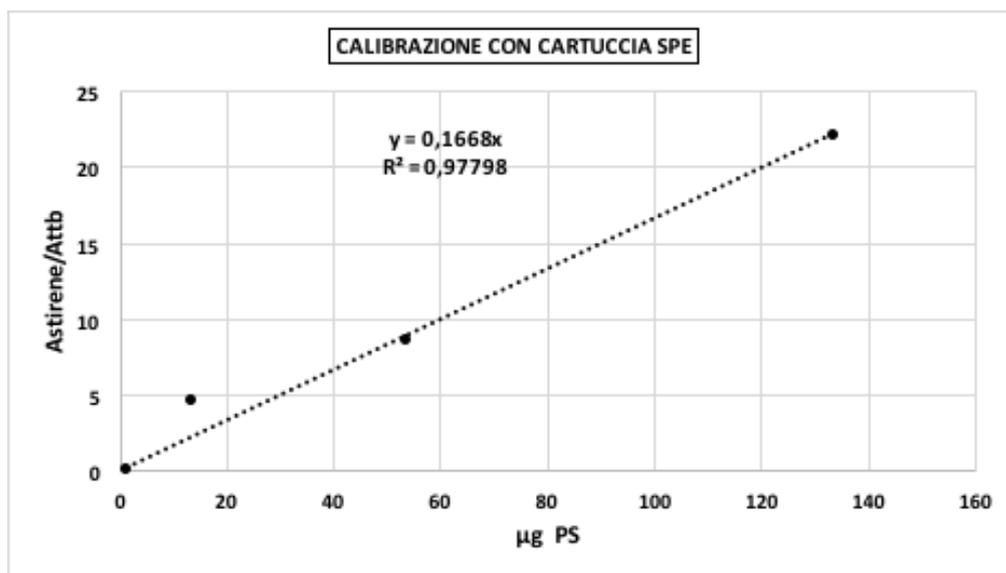


Figura 4.8: Calibrazione del polistirene granulare con cartuccia SPE con intercetta passante per l'origine. Applicata per la quantificazione dei campioni reali.

I coefficienti di correlazione (R^2) osservati sia per la fibra SPME (R^2 : 0.990) che per la cartuccia SPE (R^2 : 0.985 – 0.978) mostrano dei valori soddisfacenti. Tali valori sono comparabili con i coefficienti presentati da Fischer, M., & Scholz-Böttcher, B. M. (2017) (R^2 tra 0.94 e 0.99) ottenuti con calibrazione esterna a 18 punti da pirolisi diretta e in termochemolisi (ottenuta aggiungendo 10 μL di tetrametilammonio-TMAH al 25% in acqua) di PS standard puro con un andamento lineare di risposta rispetto alla quantità nell'intervallo 1.20 – 570 μg di PS.

4.4. Determinazione del polistirene in campioni fortificati

La procedura di determinazione del PS, applicata su campioni fortificati di tessuto muscolare di merluzzo comune (*Gadus morhua*), riassunta in figura 4.9, ha previsto la digestione del campione fortificato in 10mL di soluzione acquosa al 10% di KOH per un periodo di 4 ore alla temperatura di 90°. Successivamente alla soluzione acquosa sono stati aggiunti 10 mL di toluene, in un pallone da 50mL a fondo sferico; il pallone è stato agganciato ad un tubo refrigerante a bolle e messo a riflusso a 90°C per 60 minuti. La miscela proveniente dall'estrazione è stata travasata in un imbuto separatore per permettere la separazione della soluzione organica da quella acquosa. La soluzione ottenuta è stata quindi concentrata in rotavapor sino ad un volume finale di ~ 1 mL. Le pirolisi sono state eseguite, a ~ 500 °C (set 700°C) per 100 secondi alla massima velocità di riscaldamento, su 5

μL delle soluzioni organiche con aggiunta di $5 \mu\text{L}$ di soluzione in toluene di standard interno (TTB), alla concentrazione di 1000 mg/L .

Il prodotto principale della pirolisi del PS, lo stirene, è stato utilizzato per quantificare il PS in tessuti biologici. Il recupero percentuale è stato calcolato dal rapporto tra la quantità di PS misurato, in seguito all'analisi GC-MS, e la quantità di PS standard inizialmente addizionato. La procedura di determinazione del PS in campioni fortificati è stata eseguita con entrambe le tecniche di campionamento (fibra SPME – cartucce SPE) dei gas di pirolisi.

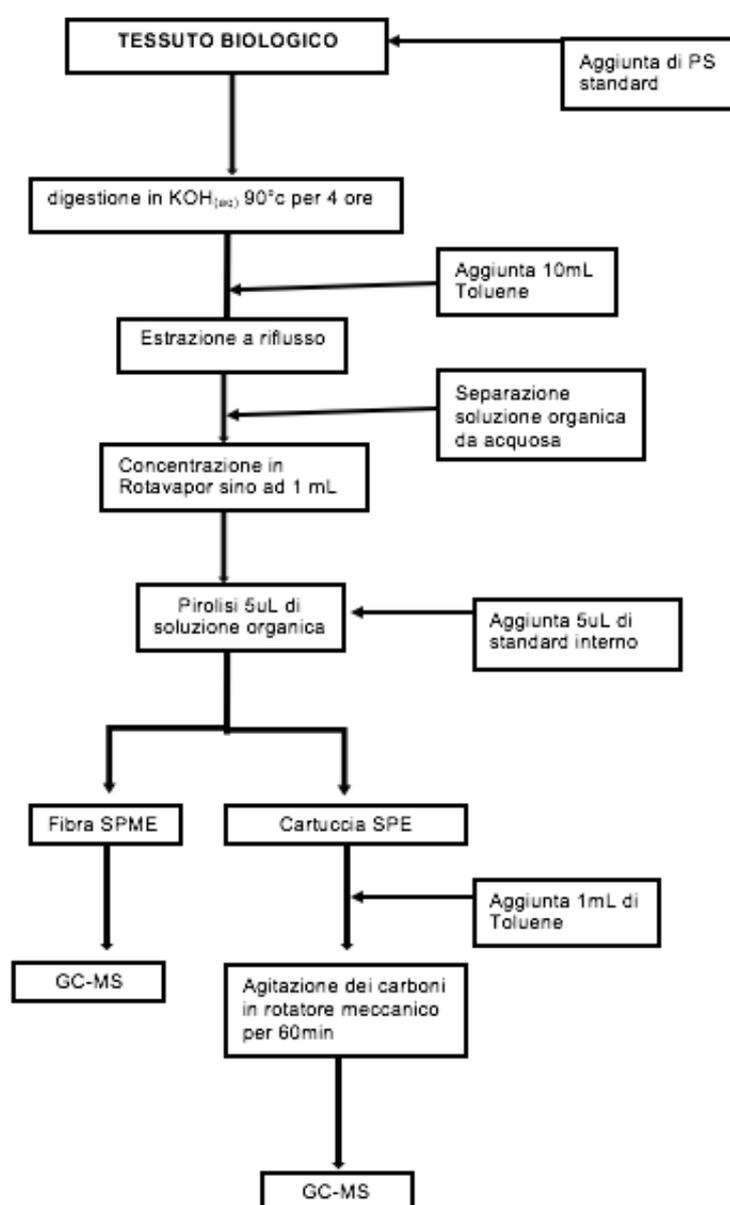


Figura 4.9: schema riassuntivo della procedura applicata per la messa appunto del metodo di determinazione del PS nei tessuti biologici.

4.4.1. Analisi dei campioni fortificati con fibra SPME

Le analisi GC-MS con fibra SPME sono state condotte in triplicato sugli estratti in toluene dei digestati di 2 campioni di tessuto muscolare (TM) di merluzzo comune (~700 mg) contaminati rispettivamente con 32.0 mg (TM-A) e 6.40 mg (TM-B) di PS standard granulare. Come si può osservare in figura 4.10 nel campione TM-A i mg attesi erano di 32.0 mg (160µg pirolizzati) mentre quelli misurati sono stati rispettivamente nei triplicati di 40.7 – 26.3 – 17.0 mg (28.0 ± 11.9 mg); invece nel campione TM-B i mg attesi erano 6.40 mg (32.0µg pirolizzati) mentre quelli misurati sono stati rispettivamente nei triplicati di 16.3 – 7.70 – 17.3 mg (13.8 ± 5.30 mg). Come si può osservare, per il campione TM-A nonostante il valore medio determinato con il metodo SPME (28 mg) è simile al valore atteso (32 mg). La deviazione standard è risultata essere molto elevata (RSD 43%). Una deviazione standard elevata si riscontra anche per il campione TM-B (38% RSD) ma inoltre è possibile notare come in questo caso il valore misurato è risultato essere maggiore (13.8 mg) del valore atteso (6.4 mg).

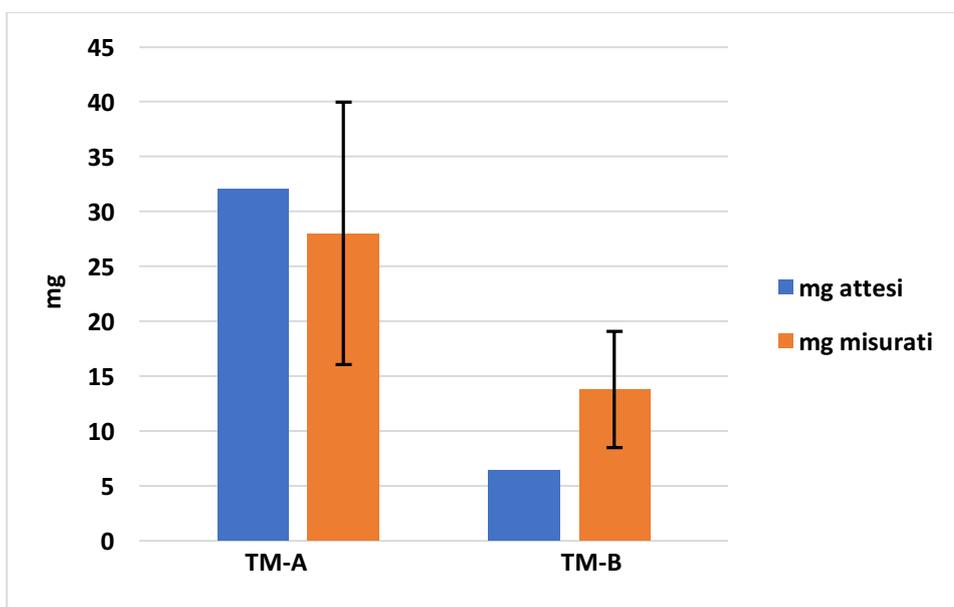


Figura 4.10: L'Istogramma mostra le quantità di PS atteso e misurato ottenute con fibra SPME nei triplicati dei 2 campioni di tessuto muscolare di merluzzo comune.

Di conseguenza, i recuperi ottenuti applicando il metodo analitico ai 2 campioni fortificati e riportati in figura 4.11. sono stati in media del 87 % (± 37 %) per i triplicati del campione TM-A, mentre i triplicati del campione TM-B mostrano dei recuperi in media del 215% ($\pm 82\%$). Da tali dati si può notare come il metodo sviluppato

presenta dei recuperi soddisfacenti per concentrazioni relativamente elevate; mentre a concentrazioni più basse i recuperi decisamente superiori al 100% suggeriscono possibili contaminazioni.

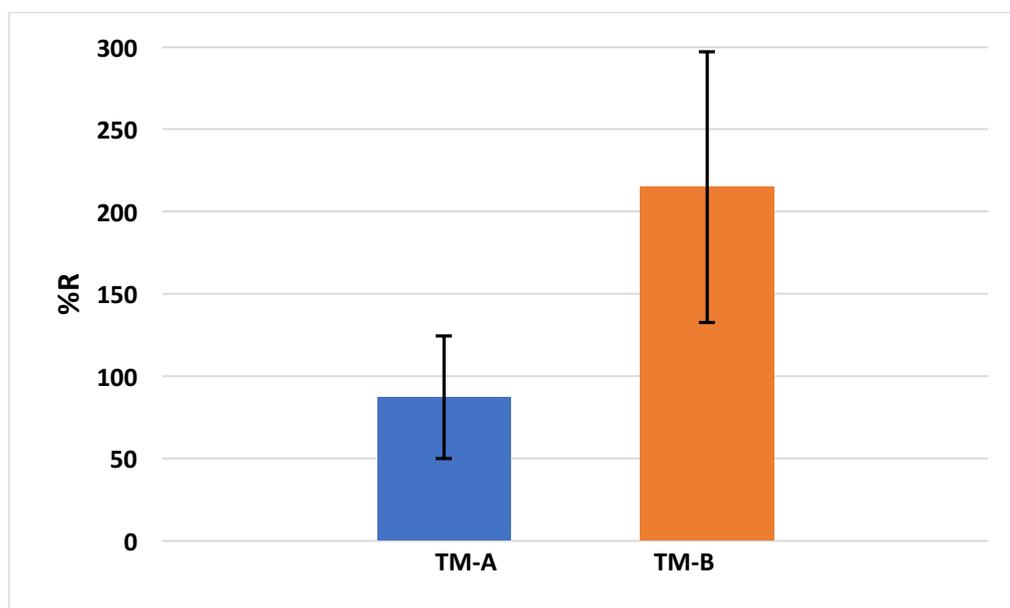


Figura 4.11: L'Istogramma mostra i recuperi ottenuti con fibra SPME nei triplicati dei 2 campioni di tessuto muscolare di merluzzo comune (fortificato TM-A: 32.0 mg, TM-B: 6.40 mg di PS).

4.4.2. Analisi dei campioni fortificati con cartuccia SPE

Le analisi in pirolisi con intrappolamento del pirolizzato con cartuccia adsorbente SPE sono state condotte in triplicato sugli estratti in toluene dei digestati di 2 campioni di tessuto muscolare (TM) di merluzzo comune (~700mg) contaminati rispettivamente con 1.00 mg (TM-C) e 2.30 mg (TM-D) di PS standard granulare (Fig. 4.9). Prima di effettuare le analisi in GC-MS, i carboni delle cartucce adsorbenti SPE sono stati travasati in un vial da 4 mL a cui è stato aggiunto 1mL di toluene e messo in agitazione con un rotatore meccanico per 1h a temperatura ambiente. Successivamente l'estratto in toluene è stato trasferito in un vial da 1.7 mL. Come si può osservare in figura 4.12 nel campione TM-C, i mg attesi erano di 1.00 mg (5.00 µg pirolizzati), mentre quelli misurati sono stati rispettivamente nei triplicati di 0.61 – 0.34 – 0.41 mg (0.45 ± 0.14 mg); nel campione TM-D i mg attesi erano 2.30 mg (11.6 µg pirolizzati), mentre quelli misurati sono stati rispettivamente nei triplicati di 1.60 – 1.30 – 2.00 mg (1.63 ± 0.35 mg). I valori della deviazione standard relativa (RSD) mostrano una variabilità del 31 % nei campioni TM-C e del 22% nei campioni TM-D.

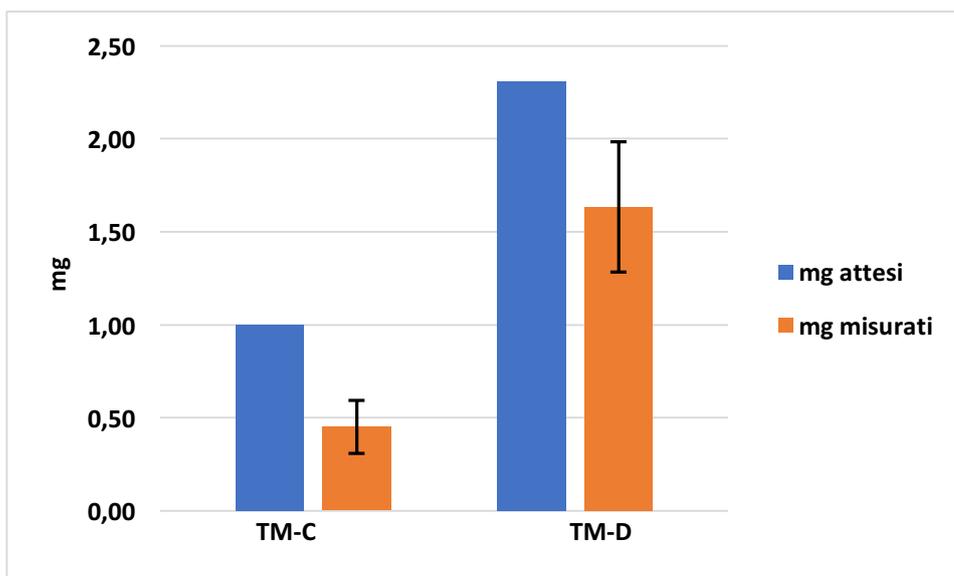


Figura 4.12: L'Istogramma mostra le quantità di PS atteso e misurato ottenute con cartuccia adsorbente SPE nei triplicati dei 2 campioni di tessuto muscolare di merluzzo comune.

Di conseguenza, i recuperi ottenuti applicando il metodo analitico ai 2 campioni fortificati, riportati in figura 4.13, sono in media del 45% ($\pm 14\%$) per i triplicati del campione TM-C; mentre per i triplicati del campione TM-D i risultati mostrano dei recuperi in media del 71% ($\pm 15\%$). Nonostante le quantità più piccole di PS analizzato, il metodo SPE presenta dei recuperi ed un grado di precisione più accettabili rispetto a quelli ottenuti con il metodo SPME.

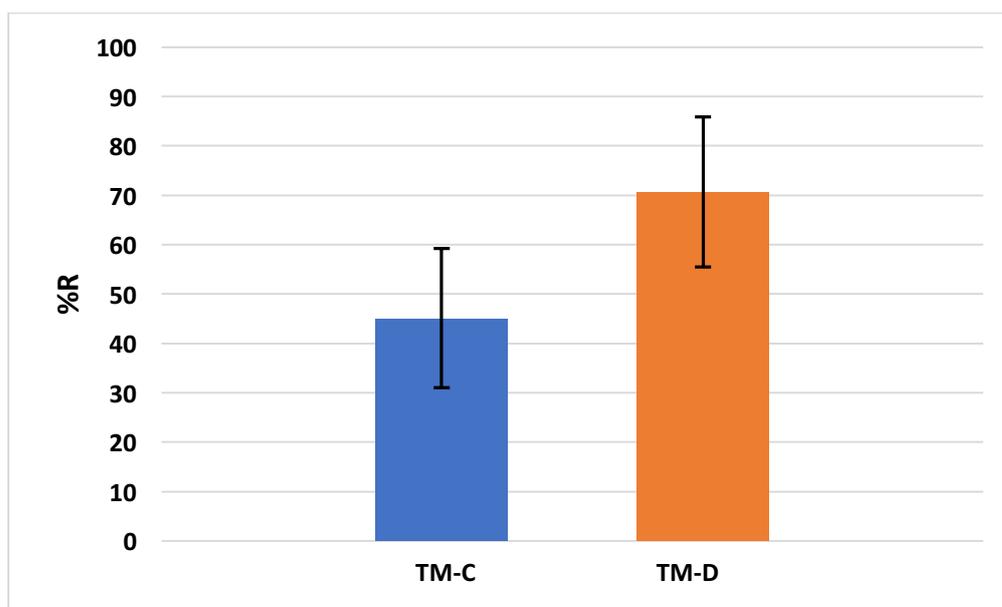


Figura 4.13: L'Istogramma mostra i recuperi ottenuti con cartuccia adsorbente SPE nei triplicati dei 2 campioni di tessuto muscolare di merluzzo comune. (fortificato TM-C: 1.00 mg, TMB-D: 2.30 mg di PS).

Come osservato dai risultati presentati in figura 4.11 e 4.13, i campioni mostrano dei valori di recupero molto variabili. La variabilità potrebbe dipendere da diversi fattori, in primo luogo la scelta del metodo di campionamento potrebbe influenzare i risultati. Come si può osservare in figura 4.10 sembrerebbe che i dati ottenuti con la fibra SPME portino a risultati migliori per quantità maggiori di PS (32.0 mg), seppure con una deviazione standard molto elevata (RSD 43%); mentre per quantità inferiori di PS (6.40 mg) i dati ottenuti mostrano valori di mg misurati di molto sovrastimati. Diversamente con le cartucce SPE (figura 4.12) si osservano dei risultati più affidabili per basse quantità di PS. Altro fattore da valutare che possa condizionare la variabilità è riferito alle potenziali perdite di PS durante la contaminazione del tessuto. Infatti potrebbero esserci perdite di trasferimento, ad esempio causate da effetti elettrostatici, dimensioni delle particelle e differenze di superficie anche su scala micrometrica che potrebbero influenzare la pirolisi e quindi i valori ottenuti dalle analisi GC-MS. Ulteriore fattore potrebbe essere legato alla scelta di adoperare lo stirene monomero come prodotto di degradazione del PS per l'analisi quantitativa. Difatti, lo studio di Fischer, M., & Scholz-Böttcher, B. M. (2017) sulla presenza di PS in campioni di tessuti biologici riporta che lo stirene può essere generato da diversi precursori, come ad esempio la chitina, la cellulosa o altri polimeri naturali come lana e fibre di cotone che possono contaminare i campioni durante il campionamento o il pretrattamento. Lo stirene non è comunque un prodotto di degradazione termica importante di polisaccaridi, mentre lo può essere da proteine (in particolare, dalla pirolisi di residui di fenilalanina) e lipidi (es. acidi grassi insaturi) (Stankiewicz, B. A. et al., 1996). Nel presente studio l'applicazione di estrazione selettiva con solvente (toluene) del polimero dovrebbe eliminare la possibile contaminazione derivante da altre matrici naturali (come proteine ed acidi grassi). Infatti, non sono stati osservati prodotti di pirolisi tipici di materiale organico di origine biologica nei pirolizzati. Sembra essere più probabile una possibile contaminazione della soluzione organica durante la fase di separazione della soluzione acquosa da quella organica (procedura descritta in dettaglio al paragrafo 3.2.3 e riassunta al paragrafo 4.4) da materiale contenete derivati dello stirene, e contaminazione di stirene nel toluene. La fase di evaporazione del toluene prima della pirolisi dovrebbe eliminare impurezze di stirene insieme al solvente, ma non eventuali contaminazioni da polistirene. Tali contaminazioni potrebbero causare una sovrastima dello stirene. A causa del fatto

che lo stirene è un prodotto di pirolisi meno specifico del PS, Fischer, M., & Scholz-Böttcher, B. M. (2017), sostengono che lo stirene trimero (2,4,6- trifenil-1-esene), seppur rivelato con un'abbondanza di molto inferiore rispetto allo stirene monomero, sia l'indicatore perfetto per l'identificazione del PS in matrici organiche in quanto la sua origine sia specifica del PS. Tuttavia nei risultati ottenuti dalle analisi del presente studio l'insufficiente abbondanza del trimero non ne ha permesso la quantificazione di PS nei tessuti biologici, motivo per cui come marker quantitativo è stato scelto lo stirene. Alla luce di quanto sopra esposto risulta necessario l'applicazione di ulteriori analisi e studi futuri che permettano una migliore configurazione sperimentale del metodo con l'obiettivo di ottenere una migliore rivelazione dei composti di degradazione specifici del PS con particolare riferimento al dimero e trimero.

4.5. Determinazione del polistirene in campioni reali

4.5.1. Ottimizzazione del metodo

Considerati i valori ottenuti dalle analisi dei campioni fortificati descritti nella sezione precedente, i campionamenti tramite cartucce SPE (ORBO™-78) rispetto a quelli ottenuti con la fibra SPME (CAR/PDMS), hanno presentato risultati maggiormente adatti ad un'analisi quantitativa. Per questo motivo la scelta per la determinazione del PS nei tessuti biologici è ricaduta sull'utilizzo delle cartucce SPE. Date le basse concentrazioni potenzialmente riscontrabili nei tessuti, la procedura di quantificazione su campioni reali (fig. 4.14) ha subito una modifica rispetto a quella applicata per la messa a punto del metodo. A differenza della messa a punto del metodo su campioni fortificati che prevedeva la pirolisi di 5 µL di estratto in toluene (procedura riassunta al paragrafo 4.4), in questo caso si è proceduto ad inserire della lana di quarzo tipicamente usata per la pirolisi (~15 mg) all'interno del pallone, contenente l'estratto in toluene. Il pallone è stato sottoposto in rotavapor per eliminare il toluene, così da trasferire il PS, eventualmente presente, nella lana di quarzo. L'intero campione di lana di quarzo veniva successivamente pirolizzato come descritto nei paragrafi precedenti. Questa modifica è stata effettuata al fine di pirolizzare tutto il PS estratto con toluene, e non solo un'aliquota. Per le analisi GC-MS l'acquisizione è stata effettuata in SIM (single ion monitoring, SIM), utilizzando gli ioni principali dell'analita (m/z 78, 104

per stirene; m/z 91, 208 per stirene dimero, m/z 91, 207 per stirene trimero); per la quantificazione del PS è stato utilizzato lo stirene (m/z 78, 104).

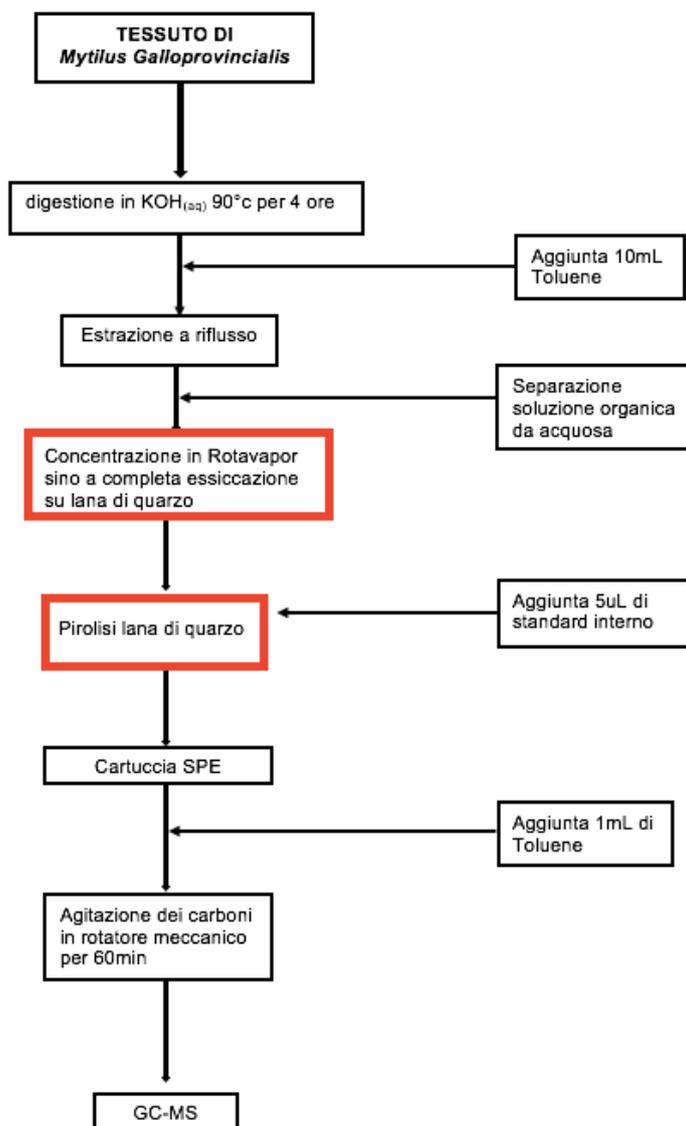


Figura 4.14: schema riassuntivo della procedura applicata per la determinazione del PS nei campioni reali. I riquadri in rosso mostrano la modifica effettuata rispetto alla procedura applicata durante la messa a punto del metodo (figura 4.9).

In seguito a tale modifica, prima di passare alle analisi dei campioni reali sono stati valutati i recuperi ed effettuate analisi di bianco procedurale (n=3). Il recupero è stato stimato da analisi di 3 aliquote, ciascuna contenente 50 µg di PS standard granulare in 10mL di toluene, di un campione standard preparato con 150 µg di PS standard granulare disciolti in 30 mL di toluene. Il recupero calcolato sulle 3 aliquote del campione standard è stato con valore medio pari al 105% (±15%). La

precisione del metodo, rappresentata dalla deviazione standard relativa (RSD), è stata del 14%. I risultati dei bianchi procedurali hanno mostrato un valore medio pari a 0.29 µg di PS (valore ottenuto con la curva di calibrazione con R^2 : 0.978). Tale valore è stato sottratto ai µg determinati nei campioni reali nel calcolo della concentrazione di PS nei tessuti. Sono state eseguite anche analisi su di un campione composito di controllo (tessuti derivanti da mitili in vasche non contaminate da PS) per tipologia di tessuto in modo da effettuare un confronto con quelli contaminati. Si osserva una concentrazione di 0.08 µg/g di PS per entrambe le tipologie di tessuto (BR e GH). Come si riporta al paragrafo 3.3, la verifica del metodo è stata effettuata su campioni compositi (4 tessuti per campione) di ghiandole digestive (GH) e branchie (BR) di mitilo mediterraneo (*Mytilus galloprovincialis*) contaminati in vivo da microsfere di PS da 3 µm e 45 µm durante uno studio condotto dalla Dott.ssa Franzellitti, S. e collaboratori che ha riguardato gli effetti ecotossicologici del PS. A titolo di esempio in figura 4.15 è riportato il tracciato GC-MS, con acquisizione in SIM (single ion monitoring), ottenuto dall'analisi di un campione composito di ghiandole digestive. In figura 4.15 sono stati numerati i prodotti di pirolisi, la cui identificazione è riportata in tabella 4.1 (paragrafo 4.2.1). Come si può osservare il cromatogramma presenta un picco intenso associato allo stirene, l'assenza del picco del 2,4-difenil-1-butene (dimero) ed un picco di debole intensità al tempo di ritenzione del 2,4,6-trifenil-1-esene (trimero). Quanto osservato coincide con i cromatogrammi ottenuti dalle analisi qualitative di PS standard in soluzione di toluene (paragrafo 4.2.2).

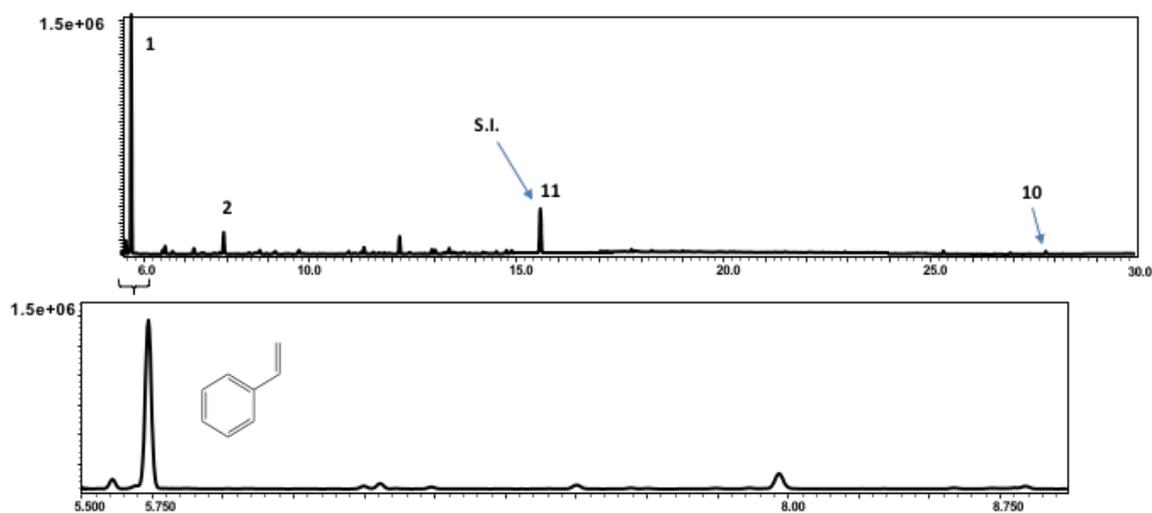


Figura 4.15: Cromatogramma in SIM ottenuto da analisi GC-MS di un campione composito di ghiandole digestive. In alto cromatogramma intero. In basso l'ingrandimento della sezione dove ricade lo stirene. I numeri dei picchi si riferiscono alla tabella 4.1.

Preliminarmente alla discussione dei risultati numerici, è opportuno segnalare alcuni aspetti utili per la loro valutazione critica. Lo stirene dimero è un composto specifico del PS, ma non è stato mai rivelato nei pirolizzati. Lo stirene trimero, l'altro indicatore specifico del PS, è stato rivelato con un picco di bassa intensità solo nei pirolizzati dei tessuti dei mitili esposti nelle vasche alle più elevate concentrazioni di PS. La difficoltà di rivelare i dimeri e trimeri dello stirene è un limite del metodo che dovrà essere superato in studi futuri. Non si può escludere che la presenza di PS nel controllo possa essere dovuta ad una contaminazione dalla procedura analitica, come indicato dalle analisi dei bianchi. Anche se il valore del bianco è stato sottratto, i valori di concentrazione più bassi potrebbero essere influenzati da fluttuazioni statistiche poiché si lavora nel limite inferiore della curva di calibrazione. Data la scarsità di campione e le basse concentrazioni potenzialmente riscontrabili nei singoli tessuti si è preferito analizzare campioni compositi invece di effettuare delle repliche, il grado di precisione può essere assunto intorno a $\pm 14\%$ di deviazione standard relativa, come riportato in precedenza.

Sono state effettuate singole analisi su 12 campioni compositi suddivisi e analizzati per tipologia di tessuto (BR e GH), dimensioni del PS (3 μm e 45 μm) e concentrazione (1.50 $\mu\text{g/L}$, 150 ng/L e 15.0 ng/L per le microparticelle da 3 μm — 2.25 $\mu\text{g/L}$, 225 ng/L e 22.5 ng/L per quelle da 45 μm) di microparticelle di PS a cui erano stati precedentemente esposti i mitili nelle diverse vasche. Tenuto conto dei tempi (4 giorni), dei volumi di acqua (10 L per vasca) e delle concentrazioni di microparticelle di PS impiegati negli esperimenti di esposizione dei mitili, si può affermare che i mitili sono stati esposti per l'intera durata dell'esperimento a quantità assolute di PS rispettivamente pari a 60, 6.0 e 0.60 μg per le PS 3 μm e a 90, 9.0 e 0.90 μg per le PS 45 μm . In figura 4.16 sono mostrate le concentrazioni di PS (esprese in $\mu\text{g/g}$ di campione – peso umido) determinate dalle analisi nelle branchie e nelle ghiandole digestive dei mitili esposti a PS 3 μm e dei mitili di controllo. Questi tessuti sono stati selezionati per gli scopi di questa Tesi in quanto potenzialmente più esposti all'accumulo e agli effetti delle microplastiche di PS (Sussarellu, R. et al., 2016; Ward, J.E. & Shumway S.E., 2004)

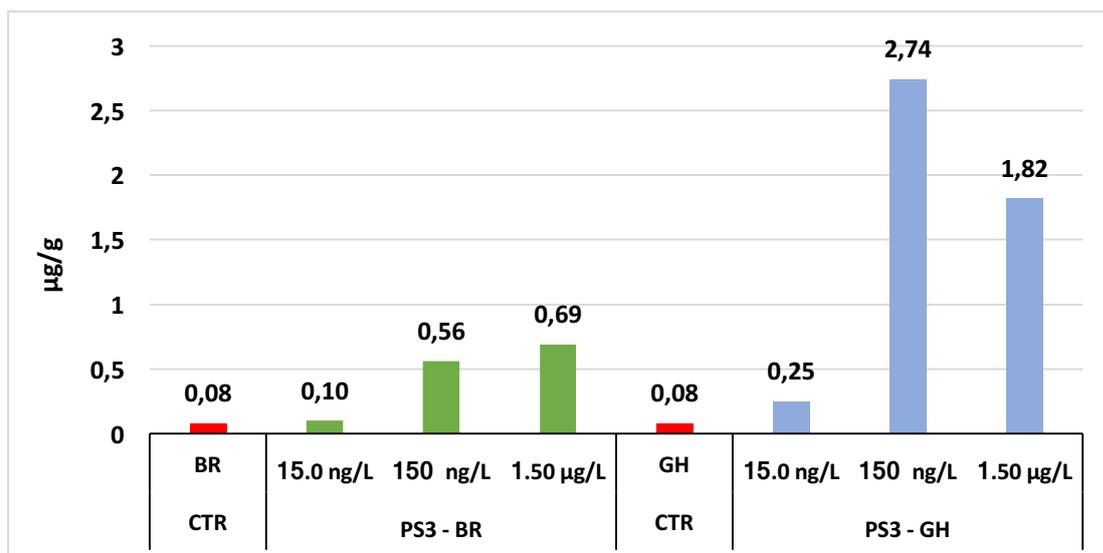


Figura 4.16: L'Istogramma mostra le concentrazioni di PS 3 μm determinate in branchie (BR, in verde) e ghiandole digestive (GH, in azzurro). In rosso sono raffigurati i rispettivi controlli.

Dalle analisi delle branchie dei mitili esposti a concentrazioni crescenti di PS, sono state rilevate concentrazioni tissutali rispettivamente pari a 0.10, 0.56 e 0.69 $\mu\text{g/g}$. Come si può notare i campioni sperimentali si discostano dal controllo, ad eccezione del campione di branchie (0.10 $\mu\text{g/g}$), dei mitili esposti alle più basse concentrazioni (15.0 ng/L), nel quale il PS rispetto al controllo è superiore soltanto di una concentrazione minima di 0.02 $\mu\text{g/g}$. Detto valore può essere giustificato dal fatto che la quantità totale di PS alla quale erano stati esposti i mitili, nell'intero periodo di esposizione, è stata di 0.60 μg . Allo stesso modo, per quanto concerne le analisi delle ghiandole digestive, sono state determinate concentrazioni rispettivamente pari a 0.25, 2.74 e 1.82 $\mu\text{g/g}$. Anche in questo caso i campioni sperimentali si discostano dal controllo, ma in misura maggiore rispetto a quanto osservato per le branchie. Le analisi hanno riportato, sia per le branchie che per le ghiandole digestive, valori di concentrazioni crescenti, mostrando un andamento proporzionale alle concentrazioni nominali con le quali erano stati trattati i mitili. Unica eccezione è rappresentata dal campione di ghiandole digestive dei mitili esposti alla concentrazione intermedia (150ng/L), la quale mostra una concentrazione superiore rispetto agli altri 2 campioni. Anche se il dato può sembrare anomalo ricade comunque all'interno della quantità massima di PS ($\leq 9.00 \mu\text{g}$) attesa per quel campione.

In figura 4.17 sono riportate le concentrazioni di PS 45 μm (esprese in $\mu\text{g/g}$ di campione – peso umido) rilevate nelle branchie e ghiandole digestive.

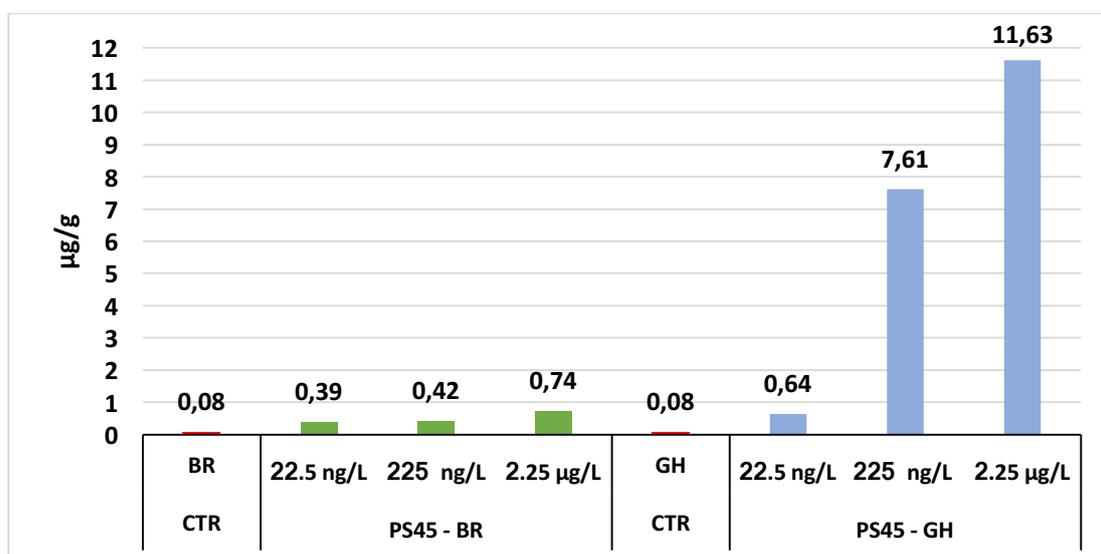


Figura 4.17: L'istogramma mostra le concentrazioni di PS 45 μm determinate in BR (in verde) e GH (in azzurro). In rosso sono raffigurati i rispettivi controlli.

Le analisi delle branchie dei mitili esposti a concentrazioni crescenti hanno mostrato concentrazioni rispettivamente pari a 0.39, 0.42 e 0.74 $\mu\text{g/g}$. Mentre per le ghiandole digestive le concentrazioni determinate sono state pari a 0.69, 7.61 e 11.63 $\mu\text{g/g}$. Il confronto dei campioni sperimentali con il controllo mostra considerevoli differenze per entrambe le tipologie di tessuto analizzate. Inoltre è possibile osservare che l'andamento delle concentrazioni determinate dalle analisi per le PS 45 μm , per entrambe le tipologie di tessuto, è proporzionale alle concentrazioni nominali alle quali erano stati esposti i mitili durante lo studio riguardante l'ecotossicità del PS.

In base a quanto osservato si può affermare che i livelli di accumulo più elevati di PS sono state rilevate nelle ghiandole digestive rispetto alle branchie. Questo può essere giustificato dal fatto che negli organismi filtratori, come i mitili, le branchie rappresentano la barriera esterna tra l'organismo e l'ambiente, il primo sito d'interazione con i contaminanti presenti nell'acqua, ma anche la principale via di eliminazione dei prodotti delle attività metaboliche e delle particelle non assimilate (Silverman, H. et al., 1996). Quindi le branchie possono essere considerate un tessuto di passaggio a differenza della ghiandola digestiva che è un sito di accumulo per molti microinquinanti (Scaglione, M., 2016).

Un confronto tra i risultati ottenuti dalle analisi dei tessuti biologici con PS 3 μm e quelle ottenute con le PS 45 μm , mostra che le maggiori concentrazioni sono state determinate nei tessuti esposti alle PS 45 μm . Un'interpretazione può essere ricercata nelle strategie alimentari dei mitili, che determinano la loro capacità di assimilare microplastiche dalla colonna d'acqua (Van Cauwenberghe, L. et al., 2015-b). Infatti i mitili sono filtratori selettivi, ossia ingeriscono alghe e particelle di forma e dimensione selezionate, eliminando le altre particelle attraverso le feci e le pseudo-feci (materiale assorbito dalla colonna d'acqua ed eliminato prima dell'ingestione). Van Cauwenberghe, L. et al., (2015-b), in seguito ad esperimenti condotti su popolazioni naturali di mitili campionati lungo le coste franco-belghe del mare del Nord, ha documentato che l'intervallo di dimensione per l'accumulo delle microplastiche è compreso tra 20 e 90 μm , mentre le pseudo-feci degli stessi animali contenevano particelle in un intervallo più ampio, compreso tra 15 e 500 μm . Browne, M.A. et al., (2008), invece ha dimostrato che in esemplari di *Mytilus edulis* trattati in condizioni di laboratorio, circa il 60% delle particelle di polistirene da 3 μm sono trasferite al sistema circolatorio. Questo processo potrebbe essere condizionato sia dalla dimensione delle particelle che potenzialmente facilitato dall'attività di fagocitosi degli emociti (Scaglione, M.,2016). Dato che nel presente studio sono stati sottoposti ad analisi solo 2 tessuti e non l'intero animale, la rivelazione di microplastiche potenzialmente trasferite in altri tessuti non è disponibile.

5. CONCLUSIONI

Le microplastiche rappresentano un potenziale rischio per gli invertebrati marini, poiché le loro dimensioni di fatto si sovrappongono a quelle delle particelle organiche che rappresentano la fonte di alimentazione per gli animali alla base delle reti trofiche marine. La determinazione delle microplastiche nei campioni ambientali, quindi rappresenta una nuova sfida per gli scienziati analitici. Tutta via le piccole dimensioni complicano la loro determinazione rispetto alle macroplastiche, richiedendo approcci analitici sempre più sofisticati. Con tali presupposti un metodo analitico quali-quantitativo delle particelle di plastica è indispensabile per ottenere risultati affidabili.

In questo lavoro di tesi sono presentati i primi risultati di un nuovo metodo applicato per l'analisi quali-quantitativa di microplastiche di polistirene in tessuti biologici, previa digestione alcalina della matrice organica, estrazione con toluene, e pirolisi analitica. Il metodo combina i vantaggi della pirolisi analitica nella configurazione off-line, con i vantaggi delle analisi in gascromatografia-spettrometria di massa (GC-MS), permettendo quindi sia di analizzare masse molto piccole di campione che d'identificare in maniera affidabile il polistirene rispetto ad altre plastiche dall'analisi dei principali prodotti specifici di degradazione termica.

L'applicazione del protocollo di digestione alcalina della matrice biologica ha portato a dei buoni risultati garantendo un'efficiente digestione per le 3 tipologie di tessuto biologico analizzato (> 97%). I buoni risultati ottenuti e le brevi tempistiche di applicazione del metodo suggeriscono l'ampia applicabilità della procedura per le analisi di routine. L'utilizzo del toluene come solvente di estrazione, ha permesso la separazione del polistirene dalla matrice biologica che poteva interferire nell'analisi.

Le analisi qualitative effettuate tramite pirolisi off-line sulle tre tipologie di PS standard disciolto in toluene (3 µm, 45 µm e granulare) e successiva analisi in GC-MS di entrambe le trappole (fibra SPME e cartucce SPE) hanno mostrato dei cromatogrammi molto simili tra loro, caratterizzati dalla presenza dello stirene come prodotto di pirolisi principale. Questo indica che non esistono differenze nei prodotti di degradazione tra le diverse tipologie di PS e che quindi una determinata identificazione può essere effettuata indipendentemente dal tipo di PS pirolizzato. L'uso delle cartucce SPE ha permesso il riconoscimento del PS, attraverso i

prodotti di degradazione caratteristici, seppure con picchi di debole intensità, dello stirene dimero e trimero. Diversamente per fibra SPME, i risultati hanno mostrato un'abbondanza elevata per il monomero ma un'assenza di dimero e trimero.

L'analisi quantitativa è stata condotta utilizzando il metodo dello standard interno, e l'area del picco cromatografico dello stirene. Il protocollo di calibrazione applicato sia su fibra SPME che su cartucce SPE ha mostrato una discreta risposta rispetto alla quantità analitica con coefficienti di correlazione compresi tra 0.978 e 0.990.

Osservando i risultati ottenuti dalla procedura di quantificazione applicata su campioni biologici fortificati si può affermare che:

L'utilizzo della fibra SPME come metodo di campionamento dei prodotti di pirolisi potrebbe non essere idonea per la quantificazione del PS in tessuti biologici in quanto dai risultati ottenuti si possono osservare valori eccessivamente variabili e probabilmente non affidabili, il metodo presenta una precisione con degli RSD, su 2 campioni in triplicato, del 38% e 43 % ed un recupero in media del 87% (± 37 %) e 215% (± 82 %). Da tali dati si può notare come il metodo sviluppato presenta dei recuperi soddisfacenti per concentrazioni relativamente elevate; mentre a concentrazioni più basse i recuperi decisamente superiori al 100% suggeriscono possibili contaminazioni.

L'utilizzo delle cartucce SPE invece, nonostante le quantità più piccole di PS analizzato, presenta dei recuperi ed un grado di precisione più accettabili rispetto a quelli ottenuti con il metodo SPME. Il metodo presenta una precisione con degli RSD, su 2 campioni in triplicato, del 22% e 31% ed un recupero in media del 45% (± 14 %) e 71% (± 15 %). Tuttavia, anche se i dati ottenuti sembrerebbero maggiormente adatti ad un'analisi quantitativa, i risultati mostrano valori molto variabili.

La procedura di quantificazione con cartucce SPE è stata modificata per poterla applicare a campioni di branchie e ghiandole digestive provenienti da esperimenti in acquario con mitili caratterizzati da concentrazioni relativamente basse di PS. Dati preliminari di valutazione del metodo su campioni standard hanno mostrato una precisione con un RSD del 14 % e recuperi quantitativi. I risultati delle analisi indicano la presenza di PS nei tessuti dei mitili a livelli del ug/g (peso umido). Tuttavia i valori di concentrazione più bassi potrebbero essere influenzati dalla presenza dello stirene nei bianchi procedurali e nei mitili di controllo (non sottoposti ad acque contaminate da PS), e dal fatto che si lavorava nel limite inferiore della

curva di calibrazione. Infatti anche se il metodo può considerarsi adeguato per l'analisi quantitativa in campioni ambientali, il limite di rivelazione risulta essere troppo elevato, studi futuri dovrebbero permettere una determinazione affidabile anche alle più basse concentrazioni di PS.

Sulla base dei risultati ottenuti si evince che l'intera procedura, dal trattamento del campione fino alla pirolisi analitica nella configurazione off-line con successiva analisi dei gas di pirolisi in GC-MS, presenta potenzialità per monitorare l'inquinamento da PS nei tessuti biologici. Una semplice analisi con basse quantità di campione fornisce informazioni qualitative sulla presenza di PS attraverso l'identificazione dei prodotti di degradazione caratteristici. Le stime quantitative sono anche possibili utilizzando i prodotti di pirolisi più intensi, anche se meno specifici, tenendo presente i limiti del metodo (ad esempio effetti del solvente, scelta del marker quantitativo, limite di rivelazione elevato, possibili contaminazioni durante la procedura analitica). Ulteriori indagini dovranno comportare una migliore configurazione sperimentale del metodo con l'obiettivo di migliorare la precisione e la rivelazione dei composti di degradazione specifici del PS.

6. RIFERIMENTI BIBLIOGRAFICI

- Andrady, A. L. (2015). *Persistence of plastic litter in the oceans*. In M. Bergmann, M. Klages, & L. Gutow (eds.), *Marine Anthropogenic Litter* (pp. 57-72). Heidelberg: Springer.
- Andrady, A. L., (2011). *Microplastics in the marine environment*. *Marine Pollution Bulletin* 62 (8), 1596–1605.
- Avio, C. G., Gorbi, S., & Regoli, F. (2015a). *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.
- Avio, C.G., Gorbi, S., Milan, M., Benedetti, M., Fattorini, D., D'Errico, G., Pauletto, M., Bargelloni, L., Regoli, F., (2015b). *Pollutants bioavailability and toxicological risk from microplastics to marine mussels*. *Environ. Pollut.* 198, 211–222. doi:10.1016/j.envpol.2014.12.021
- Balbi, T., Franzellitti, S., Fabbri, R., Montagna, M., Fabbri, E., Canesi, L., (2016). *Impact of bisphenol A (BPA) on early embryo development in the marine mussel Mytilus galloprovincialis: Effects on gene transcription*. *Environ. Pollut.* 218, 1–9. doi: 10.1016/j.envpol.2016.08.050
- Barnes, D. K. A., Galgani, F., Thompson, R. C., & Barlaz, M. (2009). *Accumulation and fragmentation of plastic debris in global environments*. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London B: Biological Sciences*, 364(1526), 1985-1998.
- Bergami, E., Bocci, E., Vannuccini, M. L., Monopoli, M., Salvati, A., Dawson, K. A., & Corsi, I. (2016). *Nano-sized polystyrene affects feeding, behavior and physiology of brine shrimp Artemia franciscana larvae*. *Ecotoxicology and environmental safety*, 123, 18-25.
- Boucher, J. and Friot D. (2017). *Primary Microplastics in the Oceans: A Global Evaluation of Sources*. Gland, Switzerland: IUCN. 43pp.
- Browne, M.A., Dissanayake, A., Galloway, T.S., Lowe, D.M., Thompson, R.C., (2008). *Ingested Microscopic Plastic Translocates to the Circulatory System of the Mussel, Mytilus edulis (L.)*. *Environ. Sci. Technol* 42, 5026–5031.
- Camacho, W., Karlsson, S., (2001). *NIR, DSC, and FTIR as quantitative methods for compositional analysis of blends of polymers obtained from recycled mixed plastic waste*. *Polym. Eng. Sci.* 41 (9), 1626–1635.
- Carpenter, E.J., Anderson, S.J., Harvey, G.R., Miklas, H.P., Peck, B.B., (1972). *Polystyrene spherules in coastal waters*. *Science* 178, 749e750.
- Chae, Y., & An, Y. J. (2017). *Effects of micro-and nanoplastics on aquatic ecosystems: Current research trends and perspectives*. *Marine Pollution Bulletin*.

- Claessens, M., Van Cauwenberghe, L., Vandegehuchte, M. B., & Janssen, C. R. (2013). *New techniques for the detection of microplastics in sediments and field collected organisms*. *Marine pollution bulletin*, 70(1), 227-233.
- Cole, M., Galloway, T.S., (2015). *Ingestion of Nanoplastics and Microplastics by Pacific Oyster Larvae*. *Environ. Sci. Technol.* 49, 14625–14632. doi:10.1021/acs.est.5b04099
- 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*. *Sci Rep* 4
- Dehaut, A., Cassone, A. L., Frere, L., Hermabessiere, L., Himber, C., Rinnert, E., ... & Duflos, G. (2016). *Microplastics in seafood: benchmark protocol for their extraction and characterization*. *Environmental Pollution*, 215, 223-233.
- Dümichen, E., Barthel, A. K., Braun, U., Bannick, C. G., Brand, K., Jekel, M., & Senz, R. (2015). *Analysis of polyethylene microplastics in environmental samples, using a thermal decomposition method*. *Water research*, 85, 451-457.
- Dümichen, E., Eisentraut, P., Bannick, C. G., Barthel, A. K., Senz, R., & Braun, U. (2017). *Fast identification of microplastics in complex environmental samples by a thermal degradation method*. *Chemosphere*, 174, 572-584.
- ECR, 2011a. European Commission Regulation No. 10/2011 on plastic materials and articles intended to come into contact with food.
- ECR, 2011b. European Commission Regulation No. 835/2011 amending Regulation (EC) No. 1881/2006 as regards maximum levels for polycyclic aromatic hydrocarbons in foodstuffs.
- Fabbri, D. (2001). *Use of pyrolysis-gas chromatography/mass spectrometry to study environmental pollution caused by synthetic polymers: a case study: the Ravenna Lagoon*. *Journal of Analytical and Applied Pyrolysis*, 58, 361-370.
- Fabbri, D., & Vassura, I. (2006). *Evaluating emission levels of polycyclic aromatic hydrocarbons from organic materials by analytical pyrolysis*. *Journal of Analytical and Applied Pyrolysis*, 75(2), 150-158.
- Fabbri, D., Trombini, C., & Vassura, I. (1998). *Analysis of Polystyrene in Polluted Sediments by Pyrolysis—Gas Chromatography—Mass Spectrometry*. *Journal of chromatographic science*, 36(12), 600-604.
- 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.
- 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.

- Gago, J., Galgani, F., Maes, T., & Thompson, R. C. (2016). *Microplastics in Seawater: Recommendations from the Marine Strategy Framework Directive Implementation Process*. *Frontiers in Marine Science*, 3, 219.
- Galgani, F. (2015). *Marine litter, future prospects for research*. *Frontiers in Marine Science*, 2, 87.
- Galgani, F., Ellerbrake, K., Fries, E., & Goreux, C. (2011). *Marine pollution: let us not forget beach sand*. *Environmental Sciences Europe*, 23(1), 40.
- Galgani, F., Fleet, D., Van Franeker, J., Katsanevakis, S., Maes, T., Mouat, J., et al. (2010). *Marine strategy framework directive, task group 10 report: Marine litter*. In N. Zampoukas (Ed.), *JRC scientific and technical reports*. Ispra: European Commission Joint Research Centre.
- Galgani, F., Hanke, G., Werner, S., Oosterbaan, L., Nilsson, P., Fleet, D., Kinsey, S., Thompson, R., Van Franeker, J., Vlachogianni, T., et al., (2013). *Monitoring guidance for marine litter in european seas. MSFD GES Technical Subgroup on Marine Litter (TSG-ML)*. DRAFT REPORT, 120p.
- GESAMP (2001), IMO/FAO/UNESCO-IOC/UNIDO/WMO/IAEA/UN/UNEP, Joint Group of Experts on the Scientific Aspects of Environmental protection). *Protecting the oceans from land-based activities: land-based sources and activities affecting the quality and uses of the marine, coastal and associated freshwater environment*, Rep. Stud. No. 71, 162pp.
- GESAMP (2010), IMO/FAO/UNESCO-IOC/UNIDO/WMO/IAEA/UN/UNEP Joint Group of Experts on the Scientific Aspects of Marine Environmental Protection; Bowmer, T. and Kershaw, P.J., 2010 (Eds.), *Proceedings of the GESAMP International Workshop on plastic particles as a vector in transporting persistent, bio-accumulating and toxic substances in the oceans*. GESAMP Rep. Stud. No. 82, 68pp.
- GESAMP (2015). *“Sources, fate and effects of microplastics in the marine environment: a global assessment”* (Kershaw, P. J., 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 p.
- GESAMP (2016). *“Sources, fate and effects of microplastics in the marine environment: part two of a global assessment”* (Kershaw, P.J., and Rochman, C.M., eds). (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. 93, 220 p.
- Gregory, M.R., (2009). *Environmental implications of plastic debris in marine settings-entanglement, ingestion, smothering, hangers-on, hitch-hiking and alien invasions*. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.* 364, 2013–2025. doi:10.1098/rstb.2008.0265

- Ivleva N. P., Wiesheu, A. C., Niessner R. (2017) "*Microplastic in aquatic ecosystems.*" *Angewandte Chemie International Edition* 56.7: 1720-1739.
- Jambeck, J. R., Geyer, R., Wilcox, C., Siegler, T. R., Perryman, M., Andrady, A., ... & Law, K. L. (2015). *Plastic waste inputs from land into the ocean.* *Science*, 347(6223), 768-771.
- Jody, B. J., Arman, B., Karvelas, D. E., Pomykala Jr, J. A., & Daniels, E. J. (1997) *Method for the separation of high impact polystyrene (HIPS) and acrylonitrile butadiene styrene (ABS) plastics* U.S. Patent No. 5,653,867. Washington, DC: U.S. Patent and Trademark Office.
- Karami, A., Golieskardi, A., Choo, C. K., Romano, N., Ho, Y. B., & Salamatinia, B. (2017). *A high-performance protocol for extraction of microplastics in fish.* *Science of the Total Environment*, 578, 485-494.
- Klein, S., Dimzon, I. K., Eubeler, J., & Knepper, T. P. (2018). *Analysis, occurrence, and degradation of microplastics in the aqueous environment.* In *Freshwater Microplastics* (pp. 51-67). Springer, Cham.
- Kusch, P. (2012). *Pyrolysis-gas chromatography/mass spectrometry of polymeric materials.* In *Advanced Gas Chromatography-Progress in Agricultural, Biomedical and Industrial Applications.* InTech.
- Kusch, P., & Knupp, G. (2004). *Headspace-SPME-GC-MS identification of volatile organic compounds released from expanded polystyrene.* *Journal of Polymers and the Environment*, 12(2), 83-87.
- Lambert, S., & Wagner, M. (2018). *Microplastics are contaminants of emerging concern in freshwater environments: an overview.* In *Freshwater Microplastics* (pp. 1-23). Springer, Cham.
- Lebreton, L.C., van der Zwet, J., Damsteeg, J.W., Slat, B., Andrady, A., Reisser, J., (2017). *River plastic emissions to the world's oceans.* *Nat. Commun.* 8, 15611. [https:// doi.org/10.1038/ncomms15611](https://doi.org/10.1038/ncomms15611).
- Lithner, D., Larsson, A., Dave, G. (2011). *Environmental and health hazard ranking and assessment of plastic polymers based on chemical composition.* *Sci. Total Environ.* 409, 3309–3324.
- Lusher, A.L.; Hollman, P.C.H.; Mendoza-Hill, J.J. (2017). *Microplastics in fisheries and aquaculture: status of knowledge on their occurrence and implications for aquatic organisms and food safety.* FAO Fisheries and Aquaculture Technical Paper. No. 615. Rome, Italy
- Mahon, A. M., Officer, R., Nash, R., & O'Connor, I. (2014). "*Scope, Fate, Risks and Impacts of Microplastic Pollution in Irish Freshwater Systems.*" EPA RESEARCH PROGRAMME 2014–2020. Published by the Environmental Protection Agency, Ireland. ISBN: 978-1-84095-705-1

- Majewsky, M., Bitter, H., Eiche, E., & Horn, H. (2016). *Determination of microplastic polyethylene (PE) and polypropylene (PP) in environmental samples using thermal analysis (TGA-DSC)*. *Science of the Total Environment*, 568, 507-511.
- Maximenko, N., Hafner, J., Niiler, P. (2012). *Pathways of marine debris from trajectories of Lagrangian drifters*. *Mar. Poll. Bull.*, 65: 51–62.
- Mistri, M., Infantini, V., Scoponi, M., Granata, T., Moruzzi, L., Massara, F., ... & Munari, C. (2017). *Small plastic debris in sediments from the Central Adriatic Sea: Types, occurrence and distribution*. *Marine pollution bulletin*, 124(1), 435-440.
- Moore, C. J., Moore, S. L., Leecaster, M. K., Weisberg, S. B., (2001). *A comparison of plastic and plankton in the north pacific central gyre*. *Marine Pollution Bulletin* 42 (12), 1297–1300.
- Nuelle, M. T., Dekiff, J. H., Remy, D., & Fries, E. (2014). *A new analytical approach for monitoring microplastics in marine sediments*. *Environmental Pollution*, 184, 161-169.
- OSPAR, (2015). *OSPAR Request on Development of a Common Monitoring Protocol for Plastic Particles in Fish Stomachs and Selected Shellfish on the Basis of Existing Fish Disease Surveys*. In: ICES Advice 2015-Book, 1, pp. 1e6.
- PlasticsEurope, (2016). *Plastics the facts 2016 - an analysis of european plastics production, demand and waste data*. Association of Plastic Manufacturers, Brussels, 34. URL: <http://www.plasticseurope.org/Document/plastics---the-facts-2016-15787.aspx?Page=DOCUMENT&FoIID=2>
- 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* 364, 1999-2012.
- Saido, K., Koizumi, K., Sato, H., Ogawa, N., Kwon, B. G., Chung, S. Y., ... & Kadera, Y. (2014). *New analytical method for the determination of styrene oligomers formed from polystyrene decomposition and its application at the coastlines of the North-West Pacific Ocean*. *Science of the Total Environment*, 473, 490-495.
- Scaglione, M. (2016). *Contaminanti associati alla presenza di microplastiche in ambiente marino: effetti fisiologici sul mitilo *Mytilus galloprovincialis**. Tesi di laurea in Adattamenti degli animali all'ambiente marino. A/A 2015/2016
- Shim, W. J., Hong, S. H., & Eo, S. E. (2017). *Identification methods in microplastic analysis: a review*. *Analytical Methods*, 9(9), 1384-1391.
- Silverman, H., Lynn, J. W., & Dietz, T. H. (1996). *Particle capture by the gills of *Dreissena polymorpha*: structure and function of latero-frontal cirri*. *The Biological Bulletin*, 191(1), 42-54
- Stankiewicz, B. A.; vanBergen, P. F.; Duncan, I. J.; Carter, J. F.; Briggs, D. E. G.; Evershed, R. P. (1996) *Recognition of chitin and proteins in invertebrate cuticles*

using analytical pyrolysis gas chromatography and pyrolysis gas chromatography mass spectrometry. Rapid Commun. Mass Spectrom., 10 (14), 1747–1757.

STAP (2011). *Marine Debris as a Global Environmental Problem: Introducing a solutions based framework focused on plastic*. A STAP Information Document. Global Environment Facility, Washington, DC.

Sussarellu, R., Suquet, M., Thomas, Y., Lambert, C., Fabioux, C., Pernet, M. E. J., ... & Corporeau, C. (2016). *Oyster reproduction is affected by exposure to polystyrene microplastics*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 113(9), 2430-2435.

Taylor, M. L., Gwinnett, C., Robinson, L. F., & Woodall, L. C. (2016). *Plastic microfibre ingestion by deep-sea organisms*. *Scientific reports*, 6.

Thompson, R. C. (2015). *Microplastics in the marine environment: Sources, consequences and solutions*. In *Marine anthropogenic litter* (pp. 185-200). Springer International Publishing.

UNEP (2016) *Marine plastic debris and microplastics – Global lessons and research to inspire action and guide policy change*. United Nations Environment Programme, Nairobi.

UNEP and GRID-Arendal, (2016). *Marine Litter Vital Graphics*. United Nations Environment Programme and GRID-Arendal. Nairobi and Arendal. www.unep.org, www.grida.no

Van Cauwenberghe, L., & Janssen, C. R. (2014). *Microplastics in bivalves cultured for human consumption*. *Environmental Pollution*, 193, 65-70.

Van Cauwenberghe, L., Claessens, M., Vandegehuchte, M.B., Janssen, C.R., (2015-b). *Microplastics are taken up by mussels (Mytilus edulis) and lugworms (Arenicola marina) living in natural habitats*. *Environ. Pollut.* 199, 10–17.

Van Cauwenberghe, L., Devriese, L., Galgani, F., Robbens, J., & Janssen, C. R. (2015-a). *Microplastics in sediments: a review of techniques, occurrence and effects*. *Marine environmental research*, 111, 5-17.

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.

Vlachogianni, Th., Anastasopoulou, A., For buoni, T., Ronchi, F., Zeri, Ch., (2017). *Marine Litter Assessment in the Adriatic and Ionian Seas*. IPA-Adriatic DeFishGear Project, MIO-ECSDE, HCMR and ISPRA. pp. 168

Wagner, J., Wang, Z. M., Ghosal, S., Rochman, C., Gassel, M., & Wall, S. (2017). *Novel method for the extraction and identification of microplastics in ocean trawl and fish gut matrices*. *Analytical Methods*, 9(9), 1479-1490.

- 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.
- Ward, J.E., Shumway, S.E., (2004). *Separating the grain from the chaff: particle selection in suspension- and deposit-feeding bivalves* 300, 83–130.
- Westerhout, R. W. J., Waanders, J., Kuipers, J. A. M., & van Swaaij, W. P. M. (1997). *Kinetics of the low-temperature pyrolysis of polyethene, polypropene, and polystyrene modeling, experimental determination, and comparison with literature models and data*. *Industrial & Engineering Chemistry Research*, 36(6), 1955-1964.
- Wünsch, J. R. (2000). *Polystyrene: Synthesis, production and applications* (Vol. 112). iSmithers Rapra Publishing.