

SCUOLA DI SCIENZE

Dipartimento di Chimica Industriale “Toso Montanari”

Corso di Laurea Magistrale in

Chimica Industriale

Classe LM-71 - Scienze e Tecnologie della Chimica Industriale

**Determinazione di microplastiche in ambiente
tramite pirolisi analitica: studio metodologico**

Tesi di laurea sperimentale

CANDIDATO

Elia Pelliconi

RELATORE

Chiar.mo Prof. Ivano Vassura

CORRELATORE

Prof. Daniele Fabbri

Anno Accademico 2017-2018

ABSTRACT

La plastica è un materiale fondamentale nella vita moderna, grazie ai suoi molteplici utilizzi. Tuttavia comporta un notevole problema ambientale quando da risorsa diventa rifiuto. In particolare, negli ultimi anni l'attenzione si sta sempre più concentrando sulle plastiche nell'ambiente e tra queste le microplastiche, ovvero i frammenti di dimensioni inferiori ai 5 mm, a causa della loro ubiquità e della capacità di interagire maggiormente con gli organismi viventi, con un conseguente maggiore impatto ambientale. Lo studio di questa categoria di inquinanti può essere portato avanti attraverso diversi metodi, da quelli spettroscopici a quelli termici. Questo elaborato ha quindi dimostrato le potenzialità e le criticità della pirolisi analitica per la determinazione quantitativa o semi-quantitativa di microplastiche di PET, PE e PS.

Plastic is become a fundamental material, thanks to its multiple uses, however entails a considerable environmental problem, when, from a source, it becomes a waste. In particular, in recent years attention has been increasingly focused on microplastics, fragments smaller than 5 mm, due to their ubiquity and their ability to interact more with living organisms, with a greater environmental impact. The study of this category of pollutants can be carried out through different methods, ie spectroscopics and thermals. This paper has therefore demonstrated the potential and criticality of the analytical pyrolysis for the quantitative or semi-quantitative determination of microplastics of PET, PE and PS.

INDICE

1. SCOPO DELLA TESI	1
2. INTRODUZIONE	2
2.1 Origine e storia delle materie plastiche	2
2.2 Produzione e tipologie di plastiche	3
2.2.1 <i>Dal polimero al prodotto finito</i>	6
2.3 Da risorsa a problema	7
2.4 Le microplastiche	9
2.4.1 <i>Origine delle microplastiche</i>	11
2.4.2 <i>Processi di degradazione dei materiali polimerici</i>	14
2.4.3 <i>Meccanismi di trasporto delle microplastiche in ambiente marino</i>	15
2.4.4 <i>L'impatto delle microplastiche sugli ecosistemi</i>	18
2.4.5 <i>L'impatto sulla salute umana</i>	23
2.5 Metodi di campionamento	24
2.5.1 <i>Campionamento in fase acquosa</i>	25
2.5.2 <i>Campionamento dei sedimenti</i>	25
2.5.3 <i>Campionamento del biota</i>	28
2.6 Metodi di identificazione delle microplastiche	28
2.6.1 <i>Metodo visivo</i>	29
2.6.2 <i>Metodo di tintura</i>	29
2.6.3 <i>Spettroscopia FTIR e Raman</i>	30
2.6.4 <i>Metodi termici</i>	31
3. MATERIALI E METODI	34
3.1 Materiali	34
3.2 Metodi di pirolisi analitica	34
3.2.1 <i>Pirolisi offline</i>	34
3.2.2 <i>Pirolisi online</i>	36
3.3 Calibrazione	37
3.4 Metodo di analisi dei campioni ambientali	38
3.4.1 <i>Campionamento della sabbia</i>	38
3.4.2 <i>Separazione e analisi delle microplastiche</i>	38
4. DISCUSSIONE	40
4.1 Analisi preliminari	40

4.1.1 <i>Analisi offline</i>	40
4.1.2 <i>Analisi online</i>	43
4.2 Costruzione delle rette di calibrazione	44
4.2.1 <i>Pirolisi offline</i>	44
4.2.2 <i>Pirolisi online</i>	46
4.3 Valutazione delle possibili interferenze nell'analisi di miscele polimeriche	48
4.3.1 <i>Pirolisi offline</i>	49
4.3.2 <i>Pirolisi online</i>	50
5. APPLICAZIONE DEL METODO PER L'ANALISI AMBIENTALE	55
5.1 Risultati delle analisi del campionamento di ottobre	56
5.2 Risultati delle analisi del campionamento di novembre	58
6. CONCLUSIONI	61
7. BIBLIOGRAFIA	63

1. SCOPO DELLA TESI

Il presente elaborato di tesi si inserisce in un ambito, quello delle microplastiche, che sta riscontrando una sempre maggiore attenzione sia da parte della comunità scientifica che dell'opinione pubblica, a causa delle peculiari caratteristiche di questa tipologia di inquinanti. Lo scopo principale è quello di mettere a punto un metodo di pirolisi analitica che permetta di determinare le microplastiche in campioni ambientali in modo qualitativo e, se possibile, quantitativo, attraverso lo studio dei principali prodotti di degradazione termica dei polimeri, in modalità sia offline che online.

La fase iniziale dell'elaborato ha riguardato la messa a punto vera e propria di un metodo, partendo dall'osservazione dei cromatogrammi e degli spettri di massa ottenuti dalla pirolisi analitica, da cui sono stati identificati alcuni prodotti di degradazione target per ognuno dei polimeri presi in esame (PS, PE e PET). La metodica offline ha consistito nell'intrappolamento dei prodotti di degradazione termica su cartuccia SPE, seguito da estrazione e analisi GC-MS; in quella online invece i polimeri sono stati sottoposti ad una *fast pyrolysis* tramite un pirolizzatore, quindi i prodotti di degradazione sono stati sottoposti direttamente ad analisi GC-MS. Una volta identificati i prodotti target, sono state costruite le rette di calibrazione dei diversi polimeri per entrambe le tipologie di analisi, quindi si è passato a valutare la presenza di eventuali interferenze nei segnali quando i polimeri si trovano in miscele, sia binarie che ternarie.

Infine il metodo studiato, nella tipologia online, è stato utilizzato per l'analisi quantitativa delle microplastiche in campioni di sabbia prelevati sul litorale di Rimini.

2. INTRODUZIONE

2.1 Origine e storia delle materie plastiche

Il termine plastica deriva dalla parola greca *plastikòs*, che significa “adatto ad essere modellato”, ed indica un’ampia classe di polimeri artificiali, ottenibili sia dal petrolio greggio (una percentuale del 4-6% del totale del petrolio estratto nel mondo è deputato all’industria dei polimeri), sia da altri tipi di materie prime fossili quali carbone e gas naturale, e infine da materie di origine rinnovabile, come la cellulosa e l’amido.

I polimeri sono macromolecole di elevato peso molecolare (10^4 - 10^7) costituite da una concatenazione di unità ripetenti, a loro volta derivate dalla reazione tra due o più monomeri. A seconda del comportamento possono essere classificati come termoplastici o termoindurenti. I primi possono essere fusi per riscaldamento, fino a raggiungere la condizione di fluidi viscosi, a cui può essere assegnata la forma desiderata, che poi si consolida attraverso il raffreddamento; è quindi possibile fonderli nuovamente al termine della fase d’uso e riottenere un nuovo manufatto. I secondi invece, se sottoposti a riscaldamento una volta terminata la polimerizzazione, non raggiungono la condizione di fluido viscoso, ma tendono a degradare.

La produzione di materie plastiche ha origine nel XIX secolo, con la scoperta del primo materiale semisintetico, la Parkesine, da parte dell’inglese Alexander Parkes (1862); questo materiale diede il via alla ricerca che portò, pochi anni più tardi, alla sintesi della celluloid. Tra il 1835 e il 1872 risalgono le prime, casuali, sintesi del PVC (polivinilcloruro), da parte di Regnault e Baumann, che lasciando dei palloni di cloruro di vinile esposti al sole ne permisero il processo di polimerizzazione. Un momento chiave si ebbe nel 1907, quando il chimico belga-americano Leo Baekeland creò il primo polimero completamente sintetico, la Bakelite.

Fu in particolare però negli anni '30 del Novecento e durante la Seconda Guerra Mondiale che si passò definitivamente a quella che viene chiamata l’era della plastica, con la nascita di un’industria caratterizzata da due fattori chiave: l’utilizzo del petrolio come principale materia prima di produzione (polimeri come PVC e PS furono prodotti esclusivamente da fonti fossili) e un continuo miglioramento delle tecnologie di produzione dei manufatti in materiali plastici (venne ad esempio

perfezionato lo stampaggio a iniezione). Durante la guerra l'Europa, dovendo sopperire alla scarsità di prodotti naturali, perfezionò ulteriormente l'industria polimerica; la produzione di materie plastiche ancora oggi di ampio utilizzo subì in quel periodo un aumento esponenziale. Un esempio su tutti è quello del Nylon, sintetizzato per la prima volta dalla Du Pont negli anni '30, e che durante il conflitto conobbe diversi metodi di sintesi (i tedeschi sintetizzarono il Nylon-6 in quanto la produzione della tipologia 6,6 era in mano agli Alleati).

Dal secondo dopoguerra la plastica è entrata sempre di più nella vita di tutti i giorni, essendo vista sempre di più come uno strumento capace di semplificare una grande quantità di gesti quotidiani, contribuendo a identificare quello stile di vita evoluto che, a partire dagli anni '50, si diffuse dagli Stati Uniti a tutto il mondo. La produzione di massa ha inoltre permesso nel tempo una diversificazione delle tipologie e delle applicazioni dei polimeri [1,2].

2.2 Produzione e tipologie di plastiche

Secondo il rapporto PlasticsEurope del 2017, la produzione mondiale di materie polimeriche nel 2016 è stata pari a 335 Mton, con un aumento di circa il 4% rispetto all'anno precedente. Come riportato in Figura 1,

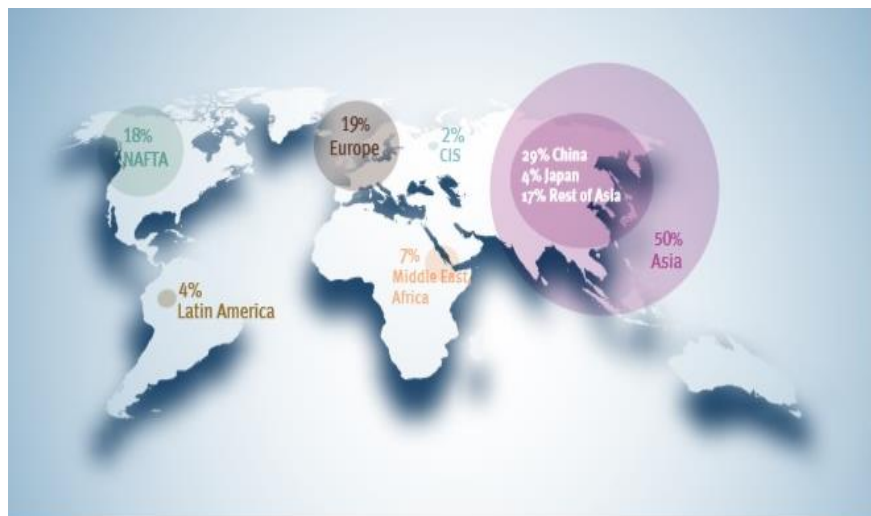
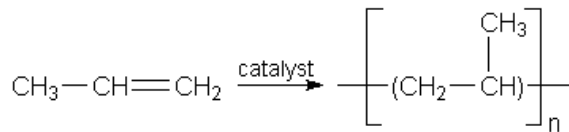


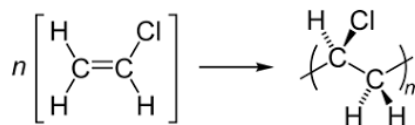
Figura 1: produzione di materie plastiche nel 2016 [3]

a livello globale il maggior produttore è la Cina, seguita dall'Europa e dai Paesi del Nafta (Canada, USA e Messico). Secondo le stime dell'UNEP (il Programma delle Nazioni Unite per l'Ambiente) si prevede che, se le tendenze attuali di produzione e consumo proseguissero con lo stesso trend, nel 2050 si produrranno ben 33 miliardi di tonnellate di plastica (Figura 2).

- Polipropilene (PP), particolarmente la forma isotattica, sintetizzata da Natta nel 1953, secondo la reazione:



- Polivinilcloruro (PVC), ottenuto a partire dal cloruro di vinile monomero attraverso processo il sospensione (S-PVC) o in emulsione (E-PVC), attraverso la reazione:

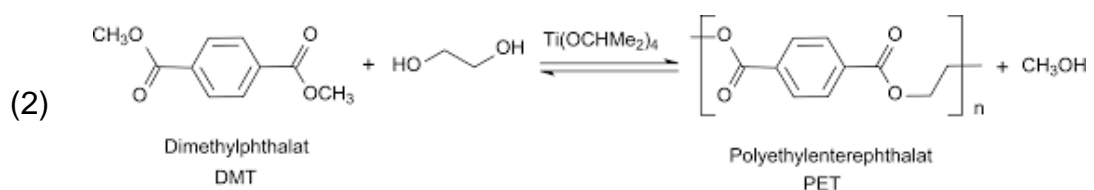
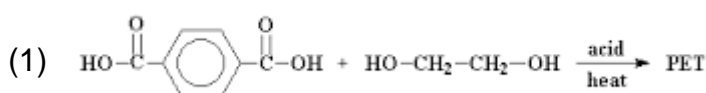


- Polistirene (PS), scoperto per la prima volta già nel 1839, si ottiene a partire dallo stirene monomero, tramite la seguente reazione:



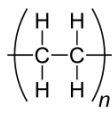
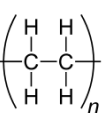
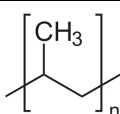
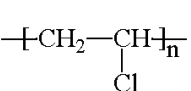
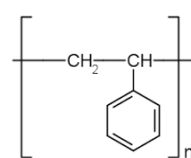
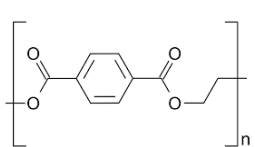
La produzione può avvenire attraverso processo in massa, in sospensione e più raramente in emulsione; è presente sul mercato in diverse tipologie, tra cui l'antiurto (HIPS) e l'espanso (EPS, il comune polistirolo);

- Polietilentereftalato (PET), sintetizzato per la prima volta nel 1941, viene ottenuto tramite processo in massa dal glicole etilenico per esterificazione con l'acido tereftalico (reazione 1) o per transesterificazione col dimetiltereftalato (reazione 2):



In Tabella 1 vengono riportati i diversi utilizzi dei principali tipi di polimeri, oltre alla loro densità.

Tabella 1: principali polimeri, formule, caratteristiche e utilizzi

Polimero	Formula	Densità/[kg/m ³]	Produzione (%)	Principali prodotti
LDPE		0,91	21	Borse di plastica, bottiglie, reti
HDPE		0,94	17	Contenitori per liquidi, tappi
PP		0,85	24	Tappi, corde, reti
PVC		1,38	19	Film, tubi
PS		1,05	6	Contenitori per cibo
PET		1,37	7	Bottiglie, fili

2.2.1 Dal polimero al prodotto finito

Molto raramente gli oggetti in materiale polimerico sono costituiti solamente dal polimero vergine. È infatti impossibile garantire tutte le proprietà, meccaniche, elettriche o termiche, che un prodotto deve possedere. Diventa perciò fondamentale la fase di compounding, ovvero l'aggiunta di additivi e cariche al polimero fuso, in modo tale da ottenere un prodotto che soddisfi tutte le esigenze sia in fase di lavorazione che durante la sua vita d'uso [5].

Gli additivi si possono suddividere in due categorie:

- Additivi essenziali, che hanno lo scopo di mantenere l'integrità della catena macromolecolare, e che quindi vanno aggiunti obbligatoriamente a tutti i polimeri, a prescindere dall'applicazione;
- Additivi opzionali, la cui tipologia varia a seconda dell'applicazione finale del prodotto e delle prestazioni che si desidera ottenere.

Fanno parte della prima categoria tutti gli stabilizzanti ai fattori degradativi, come la luce e il calore, ad esempio il carbon black. Possono venire aggiunti in quantità variabili, dai ppm fino all'1,5% in peso.

Gli additivi opzionali invece comprendono un'ampia gamma di prodotti, a seconda della funzione da svolgere. Si va dai coloranti (capaci di modificare il comportamento ottico dei polimeri) ai biocidi (particolarmente gli additivi antimuffa, aggiunti in quantità molto elevate al fine di prevenire l'attacco di microrganismi), fino ai lubrificanti, ai plastificanti e ai modificanti di impatto. Al giorno d'oggi esistono additivi provenienti anche da fonti rinnovabili, soprattutto nella categoria dei plastificanti (ad esempio a base di ESBO, ovvero olio di soia epossidato), che nel lungo termine potranno andare a sostituire i prodotti tradizionali, che spesso, come gli ftalati, presentano problemi di tossicità [6].

Nel corso del tempo il numero e le tipologie di additivi sono aumentati esponenzialmente, e questo fattore, sebbene garantisca di ottenere prodotti adatti ad ogni applicazione, crea molti problemi in fase di riciclo delle materie plastiche, poiché dopo la loro aggiunta le proprietà dei polimeri variano anche in maniera considerevole.

2.3 Da risorsa a problema

I benefici portati dai polimeri sono innumerevoli, dal punto di vista sia economico che sociale, tuttavia la produzione sempre più elevata comporta un enorme problema ambientale, connesso al fine vita. Quando infatti diventa un rifiuto, la plastica non degrada in tempi rapidi, ma rimane nell'ambiente per un periodo indefinito, tanto che ancora oggi non è possibile sapere con assoluta certezza i tempi di degradazione naturale dei manufatti polimerici.

L'inquinamento da plastica riguarda tutti i comparti ambientali, in particolar modo l'idrosfera; anche all'interno di questo comparto, il problema non si restringe solo ai

mari e agli oceani, ma la presenza di frammenti di materiale plastico sono documentati in corsi d'acqua, laghi e impianti di trattamento delle acque reflue. A livello marino, i primi studi a tal riguardo risalgono agli anni '70 [7]. Oggi si definisce rifiuto marino, secondo l'UNEP, qualsiasi materiale solido antropogenico scartato, fabbricato, smaltito e abbandonato in ambiente marino o costiero. La quantità di rifiuti plastici presenti negli oceani globalmente è sconosciuta, ma ad oggi si pensa che ogni anno circa 8 milioni di tonnellate di rifiuti plastici finiscano nei mari di tutto il mondo [8]; si stima inoltre che gli oceani possano già contenere più di 150 milioni di tonnellate di plastica, di cui circa 250000 tonnellate, sotto forma di piccoli frammenti, galleggianti in superficie. La restante parte si trova lungo tutta la colonna d'acqua, fino a raggiungere i sedimenti sui fondali [9]. I manufatti plastici più comuni sono buste, reti da pesca e contenitori per cibo e bevande, che da soli costituiscono più dell'80% dei rifiuti trovati sulle spiagge e in mare [10]. L'origine dei rifiuti plastici in ambiente acquatico è dovuta a sorgenti terrestri per una percentuale compresa tra l'80 e il 90%; di questi, circa i tre quarti dei rifiuti derivano da sistemi di raccolta e gestione dei rifiuti inefficienti, ma un ulteriore esempio è l'utilizzo di particelle plastiche nei prodotti cosmetici, vietato in Italia dal 2020 [11]; altre attività che concorrono in misura minore sono poi gli scarichi delle navi, così come le attività di pesca e di acquacoltura [12].

Il problema che questa enorme quantità di rifiuti comporta investe diversi fronti: etico, economico, ecologico ed estetico, ma non va sottovalutato neppure quello sanitario, ed è ormai un problema a livello globale, come dimostrano le recenti scoperte di manufatti in materiale plastico in Antartide [13]. A causa della resistenza di molti polimeri ai fenomeni naturali di degradazione chimica, fisica e biologica, l'accumulo di rifiuti plastici in ambiente marino viene ormai da tempo considerata una questione di primaria importanza, anche a causa degli effetti negativi che essa comporta sugli organismi planctonici e sulla fauna marina (alcuni esempi sono riportati in Figura 3).



Figura 3: esempi di impatto dei rifiuti plastici. A sinistra, ingestione di plastica da parte di un esemplare di fulmaro. A destra, il fiume Citarum, Indonesia, letteralmente coperto da rifiuti [14,15]

Un ulteriore problema collegato ai rifiuti polimerici è legato alla presenza degli additivi e delle cariche al loro interno. Una volta dispersi nell'ambiente, i rifiuti plastici possono rilasciare questi additivi, in molti casi composti tossici o pericolosi [16].

Recentemente l'attenzione si sta spostando sempre di più verso i frammenti di dimensioni minori, le cosiddette microplastiche e nanoplastiche; caratterizzate da un'elevata area superficiale, sono infatti capaci di accumulare non solo sostanze organiche pericolose, ma anche colonie batteriche. A causa delle piccole dimensioni possono essere facilmente ingerite dalla fauna marina, entrando così all'interno della catena trofica. Tuttavia gli studi relativi a questi aspetti sono ancora ad uno stadio iniziale, per cui valutare gli effetti negativi di questi materiali, così come la loro quantità, è al momento molto complicato [17].

2.4 Le microplastiche

Negli ultimi anni l'attenzione di scienziati e opinione pubblica si è sempre più spostata verso i rifiuti plastici di dimensioni più piccole, chiamati appunto microplastiche o microlitter, a causa della loro presenza ubiquitaria e dei potenziali impatti sugli ecosistemi e la salute umana. Tuttavia non esiste ancora una definizione unica e rigorosa per classificare questo tipo di materiali. In alcuni studi [18] si definiscono microlitter i frammenti di materiale plastico appena visibili che passano attraverso un setaccio da 500 μm ma vengono trattenuti da uno di 67 μm (rientrano in questo range particelle di 0,06-0,5 mm di diametro), mentre per frammenti di

dimensioni maggiori si usa il termine mesolitter. Altri invece [19] distinguono le particelle in un modo diverso: vengono indicate come macroplastiche le particelle maggiori di 25 mm, e mesoplastiche quelle tra 25 mm e 5 mm; per quanto riguarda le microplastiche, vi è un'ulteriore distinzione tra grandi microplastiche (diametro compreso tra 1 mm e 5 mm) e piccole microplastiche (dal diametro inferiore al millimetro). Altri ancora chiamano microplastiche i frammenti di dimensioni inferiori ai 5 mm e fino a 100 nm, sotto cui si entra nella categoria delle nanoplastiche [20]. Quest'ultima definizione è quella generalmente accettata, ed infatti viene riportata nelle varie legislazioni (si trova infatti sia nei regolamenti della National Oceanic and Atmospheric Administration statunitense, che nella Direttiva Quadro sulla Strategia Marina europea), così come nella maggioranza delle pubblicazioni scientifiche. La grande variabilità di forme, dimensioni e tipologie di frammenti rende molto complicata la loro identificazione e analisi, tuttavia un recente studio [21], ha evidenziato alcune caratteristiche generali, in particolare che le microplastiche:

- Si accumulano principalmente sui litorali (80%) e in maniera più limitata sulle superfici marine e nel biota;
- Si possono trovare in differenti forme, in particolar modo pellets (70%), frammenti (25%), schiume, fibre, sfere e film, in numerosi prodotti di uso comune (Figura 4);
- I polimeri più comuni, identificati attraverso le analisi, sono PE, PP e PS.



Figura 4: presenza di microplastiche in prodotti comunemente utilizzati nella vita quotidiana [22]

2.4.1 Origine delle microplastiche

Sulla base della diversa origine, le microplastiche possono essere suddivise in primarie e secondarie. Si definiscono microplastiche primarie le particelle immesse nell'ambiente direttamente di dimensioni inferiori ai 5 mm; le microplastiche secondarie derivano invece dalla degradazione dei rifiuti plastici di maggiori dimensioni in pezzi via via più piccoli. L'origine secondaria è, tra le due, la responsabile della maggioranza delle microplastiche presenti in ambiente. A seconda dell'origine, terrestre o marina, si possono elencare differenti fonti principali; inoltre, una volta prodotte sono soggette a svariati meccanismi di trasporto (Figure 5 e 6).

Principali fonti terrestri:

❖ Microplastiche primarie

- Cosmetici e prodotti per la cura personale: vengono utilizzate microsfeere come filler o abrasivi in un'ampia gamma di prodotti, dagli scrub per il viso alle creme solari (anche se, con le nuove normative europee, il loro uso è in calo);
- Pellets di resina: dalle dimensioni di alcuni millimetri, sono il materiale da cui si ottengono i prodotti plastici di uso finale;
- Abrasivi industriali: sono utilizzati ad esempio 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.

❖ Microplastiche secondarie

- Polveri da pneumatico: durante l'utilizzo, i pneumatici si corrodono, rilasciando detriti costituiti prevalentemente da gomma stirene-butadiene (60%), cariche e additivi. Questi detriti degradano poi in frammenti sempre più piccoli, che possono essere trasportati dagli agenti atmosferici;
- Fibre tessili sintetiche: il lavaggio di tessuti sintetici, nelle lavanderie industriali e casalinghe, crea microplastiche secondarie attraverso l'abrasione e la perdita di fibre, che vengono poi scaricate e, a causa della ridotta dimensione, possono potenzialmente finire in mare. I polimeri più comuni rinvenuti in questa tipologia di materiale sono poliestere, polietilene e acrilico [23].



Figura 5: sorgenti e comportamento delle microplastiche in ambiente terrestre. Le linee e le sfere rosse indicano la presenza delle microplastiche, le frecce il loro trasporto [24]

Principali fonti marine:

❖ Microplastiche primarie

- Resine plastiche: l'introduzione in mare di granuli di resine a seguito di perdite di carico è la fonte principale di microplastiche in mare;
- Cosmetici e prodotti per la cura personale: provengono principalmente dall'utilizzo di questi prodotti sulle navi da crociera.

❖ Microplastiche secondarie

- Pesca: l'uso di materiali plastici nel settore della pesca commerciale è ampiamente diffuso, rispetto alle fibre naturali tradizionali. I materiali connessi alle attività di pesca, dalle reti e lenze fino a guanti e nastri di reggiatura, finiscono in mare per abbandono, perdita o smaltimento illecito. Il loro impatto sull'ecosistema marino è ormai riconosciuto a livello mondiale, con prese di posizione da parte delle principali organizzazioni internazionali.

- Acquacoltura: con questo termine si intende l'allevamento di organismi acquatici 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. A causa di condizioni meteorologiche avverse, incidenti, perdite e usura, questi strumenti possono finire in mare, generando grandi quantità di detriti plastici [25];
- Usi ricreativi: un'importante fonte di microplastiche è legata a tutte quelle attività connesse ad un uso ricreativo del mare (attività sportive come il surf, così come le immersioni). Le cause possono essere le più svariate, dall'abbandono intenzionale alla normale usura. Le quantità, trattandosi di fonti puntuali, non sono note con esattezza, ma questa categoria viene sempre considerata una fonte rilevante;
- Crociere turistiche: anche in questo caso si tratta di una fonte puntuale, quindi stimare quantitativamente l'apporto di microplastiche in mare è difficile, tuttavia considerando 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, è facile immaginare che le quantità siano notevoli. Negli ultimi anni la gestione dei rifiuti all'interno delle navi è notevolmente migliorata, ma in molti casi questi 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.

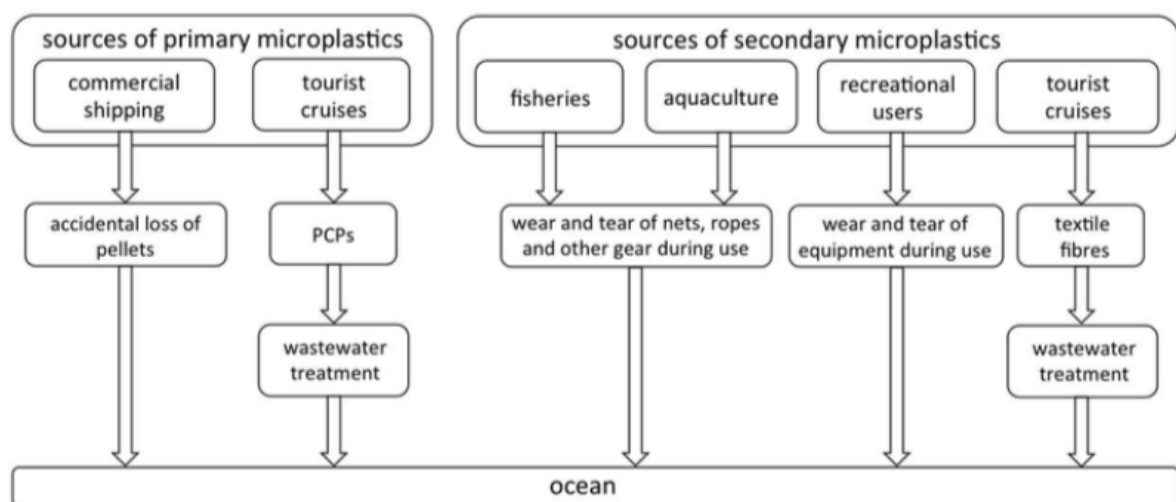


Figura 6: principali fonti marine e punti di ingresso delle microplastiche primarie e secondarie nell'oceano [26]

2.4.2 Processi di degradazione dei materiali polimerici

I fenomeni di degradazione vengono portati avanti da diversi agenti [27]; in particolare i polimeri sono soggetti a processi di:

- Biodegradazione, per effetto di organismi (solitamente batteri);
- Fotodegradazione, per effetto della luce;
- Idrolisi, per reazione con l'acqua;
- Degradazione termo-ossidativa (lenta ossidazione a temperature moderate);
- Degradazione termica, per effetto di temperature elevate.

In ogni caso, il processo di degradazione delle materie plastiche comporta un indebolimento dello strato superficiale dei manufatti, che diventano quindi suscettibili a fratture per stress dovuti a fattori sia ambientali, come l'umidità o le escursioni termiche, che meccanici, come gli urti con altri materiali.

A seconda della matrice ambientale in cui si trovano, prevalgono differenti meccanismi di degradazione tra quelli elencati sopra. Per i polimeri più comuni (LDPE, HDPE, PP, Nylon) esposti all'ambiente marino, si ha un primo stadio di degradazione foto-ossidativa indotta dalla radiazione solare UV-B. Una volta iniziata, la degradazione può proseguire per un certo tempo in maniera termo-ossidativa senza bisogno di ulteriore esposizione alla radiazione solare, fino a che è presente ossigeno. Il peso molecolare del polimero diminuisce e si formano gruppi funzionali ossigenati.

Altre tipologie di processi di degradazione, pur presenti, sono inferiori di diversi ordini di grandezza rispetto a quello appena descritto. In particolare, l'idrolisi è un fenomeno trascurabile nell'acqua di mare, non solo a livello superficiale, dove è maggiore la radiazione solare, ma anche lungo tutta la colonna d'acqua e a livello bentonico.

Il processo di degradazione avviene più velocemente sulla sabbia piuttosto che in mare. Infatti la velocità di degradazione raddoppia aumentando la temperatura di 10°C, e a causa del calore specifico relativamente basso della sabbia (664 J/kg°C), lo strato superficiale delle spiagge e i frammenti plastici ivi contenuti possono raggiungere temperature prossimi ai 40°C in estate, e anche superarli se contengono pigmenti scuri, a causa dell'assorbimento della radiazione solare infrarossa [28].

In acqua invece, il processo è rallentato sia dalle minori temperature e disponibilità di ossigeno, che da un effetto di biofouling: le particelle galleggianti vengono velocemente coperte prima da un biofilm, seguito da uno strato di alghe e infine da colonie di microrganismi. La sequenza e la cinetica con cui questo fenomeno avviene dipendono fortemente dalle condizioni marine, così come dalla stagione. In ogni caso, tutto ciò si riflette in un maggiore tempo di degradazione [29]. Perciò le plastiche direttamente scaricate in acqua, o che vi si trovino prima che subiscano fenomeni degradativi rilevanti, portano ad una minore formazione di microframmenti attraverso i meccanismi descritti precedentemente.

2.4.3 Meccanismi di trasporto delle 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 [30]. 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 rinvenuti negli ecosistemi marini sono una miscela di particelle di differenti origini e composizione; la loro presenza è stata segnalata sia in zone ad elevata densità demografica che in località più remote, come risultato del trasporto per lunghe distanze tramite l'azione di venti e correnti marine; questo rende le plastiche un problema di inquinamento di portata globale.

❖ **Trasporto superficiale**

Il trasporto delle microplastiche sulle superfici dei mari e degli oceani dipende principalmente dai venti e dalle correnti marine. La circolazione oceanica, 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" (Figura 7). I gyres rappresentano il principale meccanismo di trasporto per la dispersione dei detriti di plastica galleggianti (Figura 8) [31].



Figura 7: trash island al largo della costa dell'Honduras, 2017 [32]

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, 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 25000 a 300000 particelle/km² [33]. Elevati accumuli di particelle plastiche sono stati recentemente riscontrati anche in mari chiusi con zone costiere densamente popolate, come il Mediterraneo.

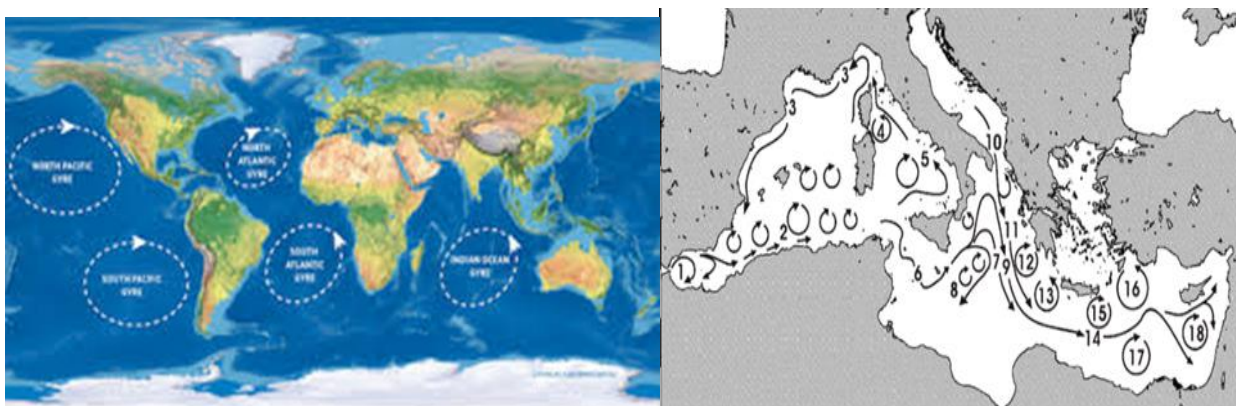


Figura 8: a sinistra, la circolazione oceanica è influenzata da 5 grandi gyres. A destra, il Mediterraneo, bacino chiuso e più piccolo, mostra una circolazione diversa, in cui è più difficile prevedere il movimento delle correnti [34, 35]

❖ Trasporto sul fondale marino

I meccanismi che influenzano il trasporto e la distribuzione delle microplastiche sui fondali marini non sono ancora pienamente noti; le correnti oceaniche profonde sono infatti 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, tuttavia vi sono poche prove empiriche per questi modelli di accumulo. 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 lontana decenni [36]. In Figura 8 sono riportati alcuni frammenti polimerici rinvenuti in campioni di acque profonde.

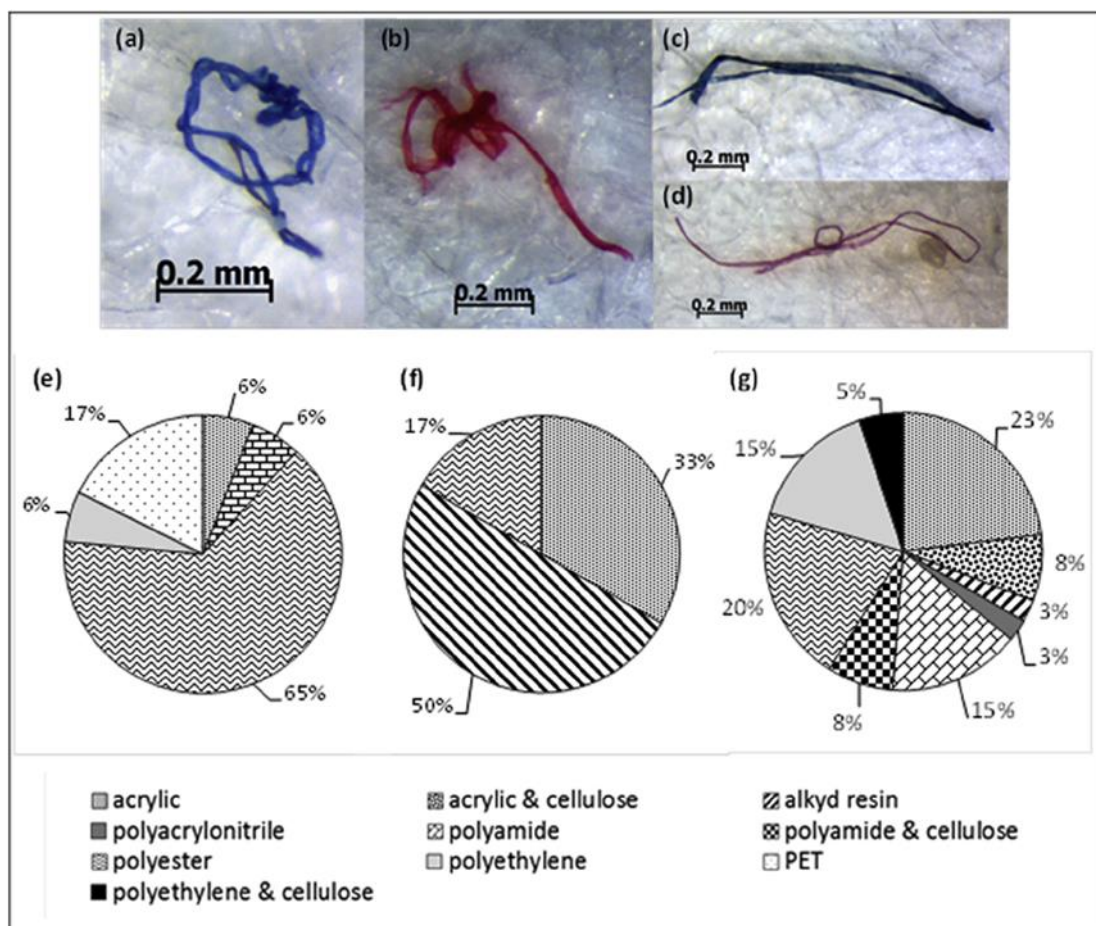


Figura 9: microfibre rilevate in campioni di acque profonde e di sedimenti, con la percentuale delle diverse tipologie di polimeri [37]

❖ Trasporto attraverso il biota

I processi biologici, come bio-incrostazioni, ingestione e aggregazione, in combinazione con i processi fisici e le proprietà delle particelle plastiche (tipologia e densità), influenzano i meccanismi di trasporto delle microplastiche. Tra i processi biologici, l'ingestione da parte degli organismi gioca un ruolo fondamentale nella redistribuzione delle particelle di plastica sia all'interno dell'oceano che, attraverso la catena alimentare, in altri comparti ambientali. 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. 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 variano a seconda della composizione della comunità microbica e se essa includa potenziali agenti patogeni [38].

2.4.4 L'impatto delle microplastiche sugli ecosistemi

Il rischio dei rifiuti plastici nei riguardi della salute umana e dell'ambiente ha ricevuto negli ultimi anni una sempre maggiore attenzione. Tuttavia, il livello reale di rischio rimane tuttora difficile da quantificare. Questo è particolarmente vero per le microplastiche: sebbene siano ormai da tempo classificate come inquinanti emergenti [39], i trend temporali o l'impatto di specifiche attività umane sono in larga parte sconosciuti, soprattutto perché la maggior parte dei dati riguardanti l'ingestione di microplastiche sono troppo recenti e i risultati non sempre comparabili. Inoltre, molti studi si sono spesso basati su test svolti in laboratorio, che prevedevano concentrazioni maggiori rispetto al livello reale e scenari di esposizione irrealistici [40]. Ciononostante è indubbio che la presenza di frammenti plastici nella biosfera comporti un enorme problema non solo dal punto di vista ecologico, ma anche economico e sociale. La presenza delle microplastiche è ormai ubiquitaria: sono

state infatti identificate anche in ambienti finora incontaminati come i poli [41], ma anche nelle acque in bottiglia e nel sale da cucina [42, 43].

Tra i comparti ambientali, la gran parte degli studi si è concentrata sugli ecosistemi marini, in quanto sono quelli che risentono maggiormente dell'impatto delle microplastiche. L'acqua di mare contiene infatti numerose micro- e nano-particelle naturali (circa 10-500 µg/L), gran parte di queste di dimensioni minori di 100 nm [44]. Gli organismi marini di ogni taglia, dallo zooplankton alle balene, interagiscono quotidianamente con esse senza apparenti effetti nocivi. L'ingestione delle microplastiche da parte del microbiota comporta infatti un altro tipo di problema, ovvero la loro capacità di trasportare e concentrare inquinanti organici persistenti (POPs); gran parte di questi composti, come i PCB e il PFOA, presentano un coefficiente di ripartizione polimero-acqua (K_{PW}) molto elevato, con conseguenti problemi dal punto di vista tossicologico. Mentre infatti nell'acqua marina i livelli di POPs sono generalmente bassi, sulla superficie dei frammenti plastici la concentrazione aumenta al punto da superare la soglia di rischio (Figura 10), soprattutto se si considera che, tramite ingestione, questi composti possono entrare nella catena alimentare. I danni che queste sostanze possono causare sono ben noti, ed infatti sono stati tradotti dall'Unione Europea in norme alimentari [45]. Una particolare attenzione si concentra su quei chemicals caratterizzati come EDC (Endocrine Disrupting Chemicals), a causa della loro capacità di distruggere o competere con la sintesi degli ormoni endogeni, anche a basse concentrazioni, con effetti sullo sviluppo degli organismi [46, 47].

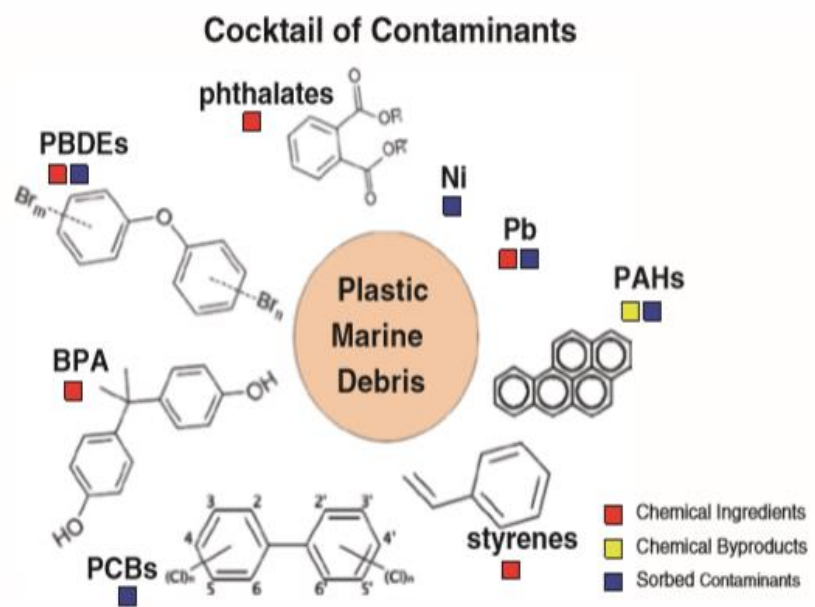


Figura 10: contaminanti presenti sui rifiuti plastici, suddivisi a seconda della diversa origine [14]

La concentrazione di chemicals assorbita dai frammenti plastici varia in base al tipo di polimero e alla sostanza. Per esempio, si osserva una più rapida saturazione di POPs nel PET e nel PVC (le cui strutture vetrose permettono il solo adsorbimento in superficie) rispetto al polietilene, in cui la diffusione all'interno della matrice polimerica facilita un rapido adsorbimento superficiale seguito da un lento aumento per assorbimento all'interno) [48] Inoltre, bisogna considerare che le alterazioni della struttura polimerica (ad esempio l'aumento dell'area superficiale) che avvengono una volta che la plastica diviene rifiuto marino portano ad un cambiamento dei modi con cui i chemicals si accumulano [49].

Un fattore importante da considerare è la comparazione dell'accumulo di sostanze pericolose sui frammenti plastici rispetto agli altri media ambientali; per diverse categorie di chemicals infatti è stata riscontrata una concentrazione molto maggiore nei primi. Ad esempio, i POPs possono accumularsi sui rifiuti plastici a concentrazioni maggiori di sei ordini di grandezza rispetto all'acqua e di due rispetto ai sedimenti [50, 51]; per quanto riguarda i metalli invece le concentrazioni sulle plastiche e nei sedimenti sono simili [52]. In Figura 11 è riportato il livello di rischio connesso alla concentrazione di PCB nelle acque costiere di tutto il mondo.

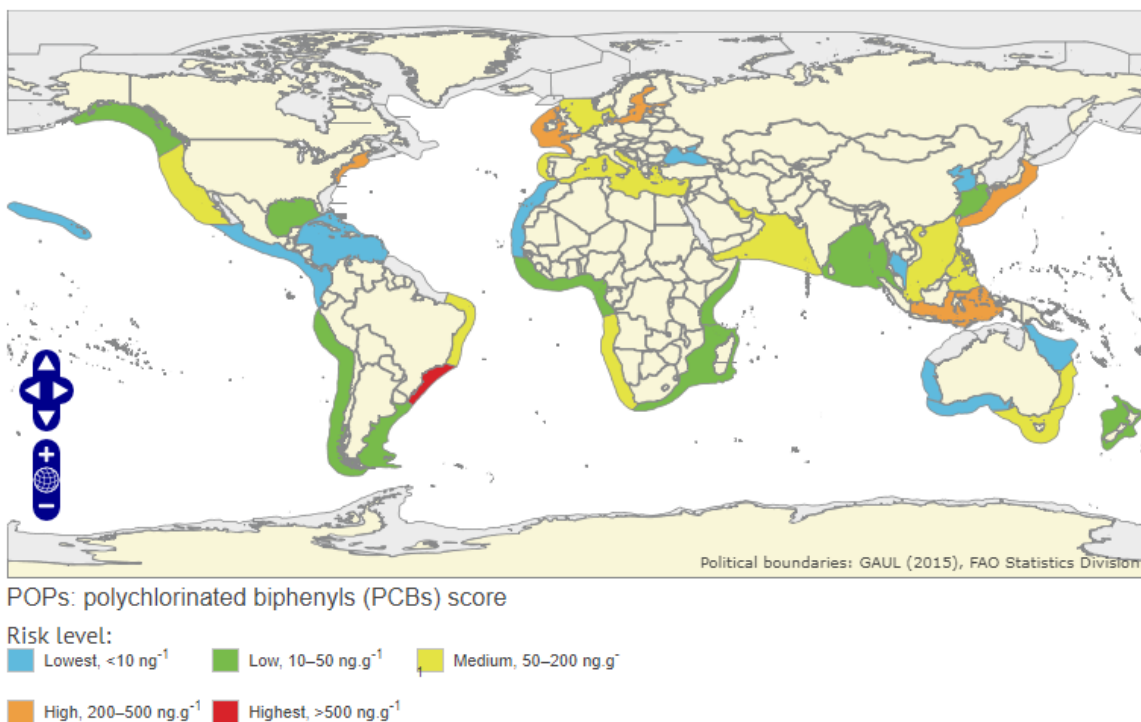


Figura 11: livello di rischio associato alla concentrazione di PCB nelle acque costiere; si possono notare livelli alti in acque dove la presenza di microplastiche è elevata (ad esempio il Sud-Est Asiatico [53])

La tossicità associata alle plastiche in generale, incluse le meso- e le microplastiche, può essere attribuita ad uno o più dei seguenti fattori:

- Monomeri residui dalla lavorazione o additivi tossici usati durante la fase di compounding possono essere rilasciati in seguito all'ingestione dei manufatti. Tra gli esempi si possono citare i residui di bis-fenolo A nei policarbonati [54] e l'uso di ftalati come plasticizzanti nel PVC [55];
- Intermedi derivanti dalla degradazione parziale dei prodotti polimerici (ad esempio il rilascio di stirene ed altri aromatici a seguito dell'incenerimento del PS);
- POPs adsorbiti sulla superficie dei microframmenti. Una volta ingeriti, questi inquinanti possono divenire biodisponibili [56];
- Colonizzazione microbica, stimolata dalla superficie idrofoba dei detriti, che porta alla formazione di quelle che vengono chiamate barriere microbiche [57].

Alcuni studi [58] hanno suggerito inoltre una capacità da parte delle microplastiche di concentrare anche i metalli. Il motivo è ancora sotto studio, ma si pensa che la superficie ossidata possa contenere funzionalità capaci di legare i metalli.

L'impatto principale delle microplastiche sugli organismi acquatici non è tanto l'intrappolamento (relativo maggiormente ai rifiuti di dimensioni maggiori), ma piuttosto la loro ingestione, 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 [59, 60]. La quantità ingerita dipende dalle dimensioni e dalla composizione delle microplastiche, ma anche dal tipo di organismo che se ne nutre. Diversi studi hanno evidenziato una correlazione tra assorbimento e dimensione: minori sono le dimensioni delle particelle maggiore è il range di assorbimento da parte della fauna, provocando impatti sulla salute dei singoli individui [61]: un esempio è la diminuzione dell'apporto nutrizionale e della capacità riproduttiva di alcune specie di mitili a seguito dell'ingestione di microframmenti di PS [62].

Non solo gli organismi acquatici subiscono l'impatto delle microplastiche, ma anche altre specie animali (Figura 12). Si sa ad esempio che circa il 44% degli uccelli marini ingerisce plastica [63]. Un recente studio evidenzia l'ingestione di microframmenti di PS da parte delle larve dei moscerini; questi vengono mantenuti durante la fase

pupale, fino allo sviluppo dell'insetto, che quindi diventa un potenziale vettore per la dispersione delle microplastiche dall'ambiente acquatico a quello aereo e terrestre [64].

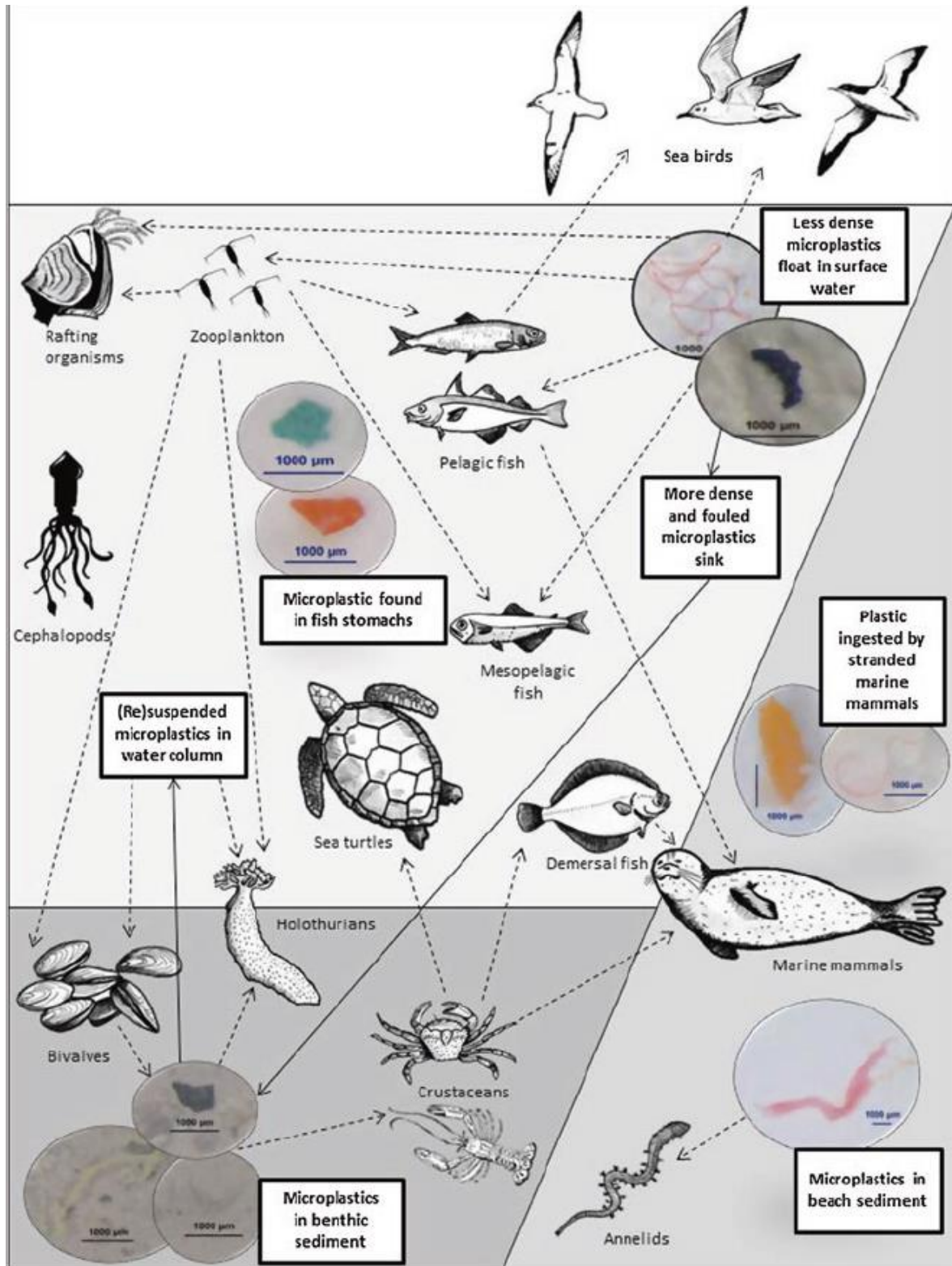


Figura 12: interazioni tra microplastiche e matrici fisiche e biologiche in ambiente marino. Le frecce continue indicano i collegamenti ambientali, quelle tratteggiate i collegamenti biologici [14]

Un fattore ancora poco investigato riguarda l'emissione di gas serra da parte dei frammenti di plastiche presenti nell'ambiente, a causa della radiazione solare. Le quantità di gas rilasciati (particolarmente quelle di CH₄ e C₂H₄) variano in base alla tipologia di polimero e alla dimensione. Le microplastiche, caratterizzate da una maggiore area superficiale rispetto ai frammenti di dimensioni maggiori, mostrano una velocità di emissione più elevata. Il tasso globale di emissioni è ancora sconosciuto, tuttavia, viste le sempre maggiori quantità di rifiuti plastici, è un elemento da tenere in considerazione [65].

2.4.5 L'impatto sulla salute umana

Anche se l'ingestione di microplastiche da parte dell'uomo è ormai un dato di fatto, rimane ancora un'elevata incertezza riguardo ai potenziali impatti sulla salute. Secondo uno studio dell'EFSA, anche nello scenario peggiore di ingestione di plastiche tramite la dieta (si stimano 7µg per porzione di mitili), il contributo all'esposizione a composti tossici sarebbe molto basso. In particolare, l'assunzione di bisfenolo A tramite ingestione di microplastiche corrisponderebbe a meno dello 0,2% in peso di esposizione tramite la dieta di questo composto per un adulto di 70kg [66].

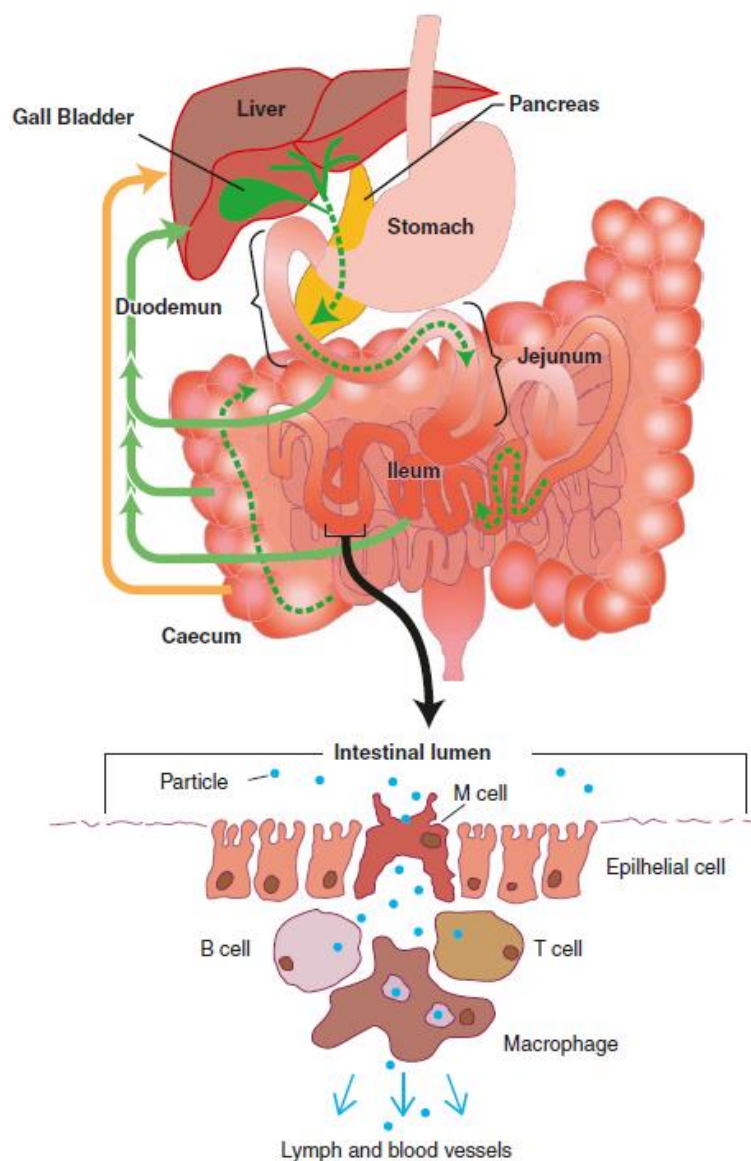


Figura 13: diagramma illustrante un possibile percorso di ricircolazione di nanoparticelle polimeriche in seguito alla loro ingestione [14]

A livello umano un'attenzione maggiore è rivolta verso le nanoplastiche, potenzialmente la frazione più pericolosa del marine litter, in quanto in grado di interagire maggiormente con le cellule (come riportato in Figura 13), portando ad effetti dannosi che vanno dalle lesioni agli organi ai cambiamenti nell'espressione di geni e proteine [67].

2.5 Metodi di campionamento

A causa delle piccole dimensioni, la determinazione delle microplastiche nei campioni ambientali è più complessa rispetto ai frammenti di dimensioni maggiori, e inoltre richiede approcci analitici sempre più sofisticati. Indipendentemente dal compartimento ambientale campionato, la matrice 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, al fine di estrarre microplastiche e ridurre il numero di particelle naturali. È inoltre obbligatorio un metodo analitico per l'identificazione delle particelle polimeriche che confermi l'affidabilità dei risultati ottenuti [68]. A seconda del comparto ambientale, si può operare una distinzione tra campionamento della fase

acquosa, del sedimento e del biota, come riassunto in Figura 14.

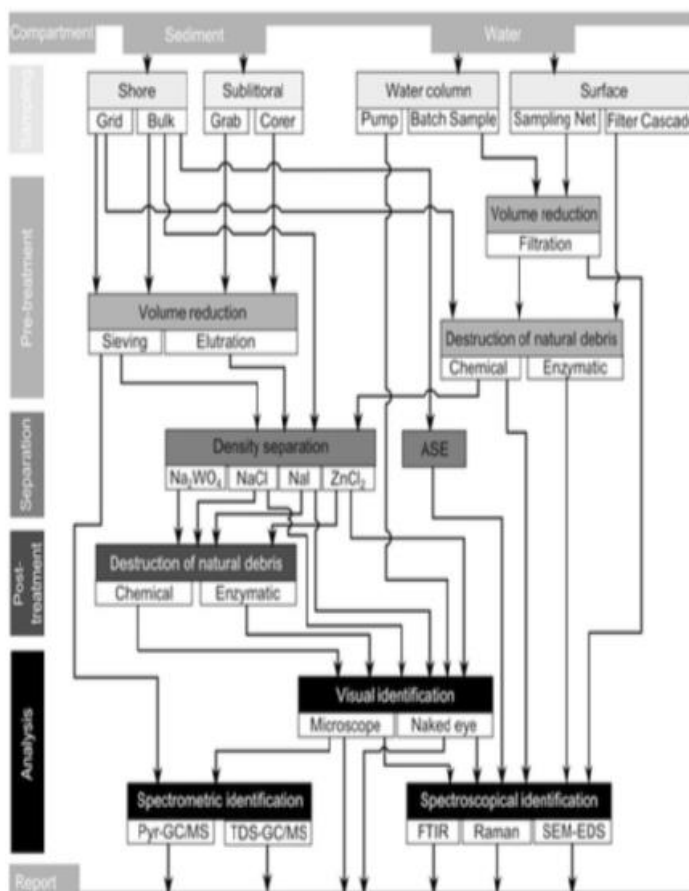


Figura 14: possibili strategie descritte in letteratura per l'analisi delle microplastiche, dal campionamento all'analisi [68]

2.5.1 Campionamento in fase acquosa

L'attività di campionamento può limitarsi alla superficie oppure riguardare tutta la colonna d'acqua, data la capacità delle microplastiche di distribuirsi in maniera ubiquitaria. È quindi necessario conoscere le variabili chimico-fisiche lungo tutta la colonna, calando una sonda multi-parametrica nel punto d'inizio del campionamento. Oltre a ciò bisogna tenere conto degli effetti di rimescolamento causati dal moto ondoso; è dunque preferibile operare in condizioni di mare calmo. Il campionamento di microplastiche in acqua viene comunemente effettuato con reti, diverse a seconda della porzione da campionare: per la superficie si utilizza comunemente la rete di tipo "manta", costruita appositamente per questo scopo, mentre per la colonna d'acqua di solito si prediligono reti da plancton. Solitamente i risultati vengono riportati in numero di particelle per km² o m³ d'acqua.

Queste tecniche di campionamento hanno il vantaggio di poter trattare elevati volumi d'acqua in tempi relativamente brevi, tuttavia presentano un fattore limitante legato alla dimensione delle maglie: più sono piccole, più velocemente si ostruiscono. Perciò nella maggior parte dei casi si sceglie di utilizzare reti con maglie di dimensioni leggermente maggiori, in modo tale da riuscire a campionare volumi maggiori. Ad esempio, le linee guida MSFD prevedono una dimensione di maglia di 333 µm, una lunghezza netta totale di 6 m e un tempo di campionamento di 30 minuti [69]. In letteratura sono presenti molti esempi di casi di campionamento, ma le diverse dimensioni delle maglie non permettono un'efficace comparazione dei dati.

2.5.2 Campionamento dei sedimenti

Attualmente gli studi riguardo a questo comparto sono relativamente pochi rispetto a quelli relativi alle acque, tuttavia l'attenzione vi si sta sempre più concentrando, in quanto può essere considerato un deposito a lungo termine per le microplastiche [70]. Il campionamento presenta approcci variabili a seconda della tipologia di sedimento che si deve analizzare: può riguardare infatti direttamente la sabbia oppure i fondali.

Il campionamento delle spiagge per l'analisi di microplastiche è relativamente semplice, e richiede l'utilizzo di uno strumento non plastico (cucchiaio, spatola o paletta) per il prelievo del campione, un telaio per definire l'area di campionamento ed un contenitore (anch'esso preferibilmente non plastico) per trasportare il

campione. Le quantità prelevate riportate in letteratura variano da meno di 500 g a più di 10 kg [71]. È ancora oggetto di dibattito il posizionamento dei punti di campionamento, in quanto la distribuzione delle microplastiche è un fattore variabile da spiaggia a spiaggia; le strategie maggiormente seguite includono un campionamento random in vari punti, oppure lungo un transetto perpendicolare o parallelo al mare [72]. Un secondo argomento di dibattito è la profondità di campionamento: un approccio comune prevede il prelievo dei 5 cm superficiali, ma in letteratura sono presenti casi in cui si raggiungono i 30 cm [73]. Non esiste ancora un metodo di campionamento standardizzato per le microplastiche nelle sabbie, anche se a livello europeo sono stati mossi i primi passi attraverso il TSG-ML (Technical Subgroup on Marine Litter), che raccomanda di campionare sulla battigia con un minimo di cinque repliche, ad una distanza di almeno 5 m l'una dall'altra, e di distinguere due categorie in base alla dimensione: large microplastics (1-5 mm) e small microplastics (20 µm-1 mm) [74].

I sedimenti subtidali possono invece essere campionati attraverso benne (ad esempio il modello Van Veen) o altri strumenti, come corer multipli. Le benne tendono a disturbare il sedimento e sono adatte per la superficie (ad esempio i primi cinque centimetri) o per il campionamento alla rinfusa, mentre i corer consentono il campionamento simultaneo di strati superficiali e di profondità, ma producono volumi di campione più piccoli. La dimensione dello strumento applicato e il tempo necessario per il suo recupero dipendono fortemente dalla profondità dell'acqua nella posizione di campionamento [75].

Una volta campionato il sedimento, è necessario separare le microplastiche dalla frazione di non interesse. Il metodo maggiormente seguito è una separazione per densità: le particelle plastiche rientrano in un intervallo di densità compreso tra 0,90 e 2,30 kg/L (Figura 15), mentre per sabbia e sedimenti si è intorno ai 2,65 kg/L. Il campione viene miscelato con un liquido di densità definita, normalmente una soluzione salina satura e agitato per un tempo definito. Dopo la decantazione, le particelle di plastica vengono separate per filtrazione del surnatante. Il liquido più comunemente utilizzato è una soluzione satura di NaCl (densità di 1,2 kg/L), perché è facilmente disponibile, poco costoso e non tossico [76]. Tuttavia questo ha lo svantaggio di separare solo i polimeri a bassa densità, mentre quelli più densi, come il PET, rimangono sul fondo insieme ai sedimenti; per far fronte a questo problema è

possibile utilizzare sali ad alta densità come NaI. Tuttavia, queste sostanze sono costose da usare: 1 kg di NaCl costa meno di 1€, mentre 1 kg di NaI ne costa circa 70. Alternative più economiche, ma comunque efficienti possono essere CaCl₂ e ZnCl₂ [77]. L'efficienza di recupero varia grandemente in base al metodo e alla soluzione utilizzata, ma generalmente per quanto riguarda le microplastiche servono più step per ottenere valori elevati; sono comunque allo studio nuovi strumenti capaci di ottenere efficienze di recupero fino al 96% in un singolo passaggio, in particolare l'MPSS (Munich Plastic Sediment Separator) [78].

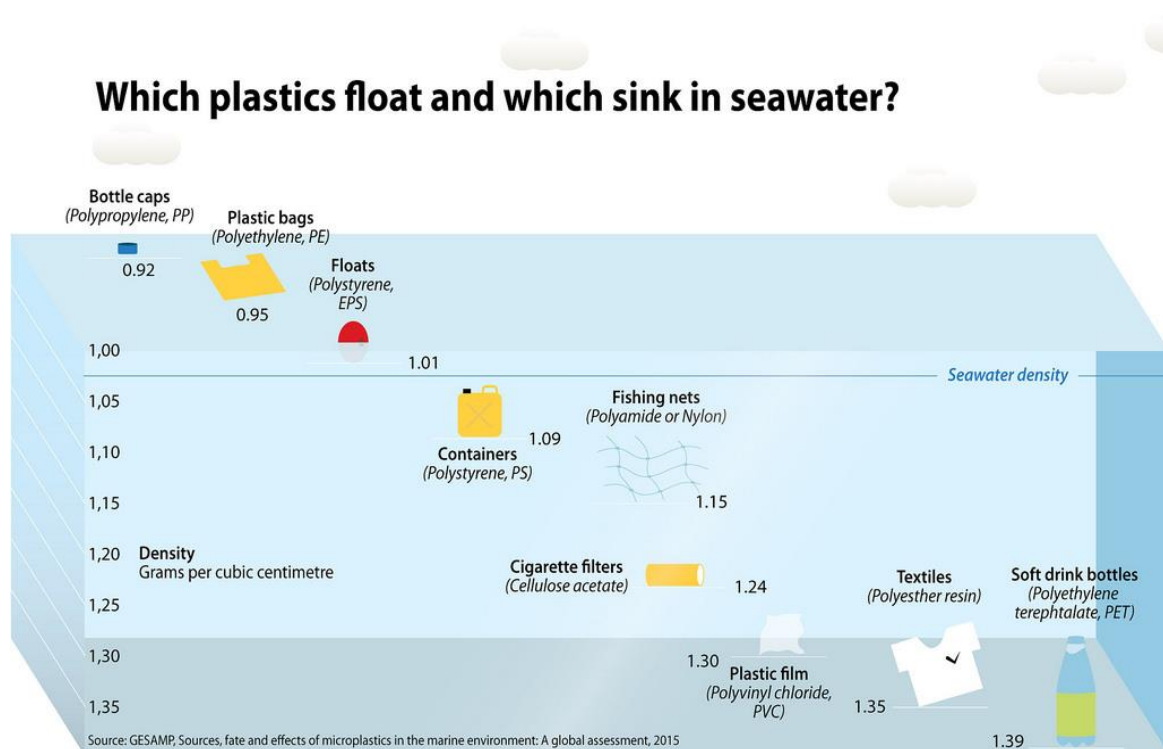


Figura 15: densità dei polimeri che compongono i più comuni manufatti plastici riscontrati nei campioni ambientali [79]

Per migliorare e semplificare l'identificazione, i campioni devono essere purificati dalla matrice organica. A tal fine è possibile applicare due diversi metodi:

- degradazione chimica: consiste nel trattamento dei campioni con sostanze chimiche, come soluzioni acquose al 30% di H₂O₂ o miscele H₂O₂/H₂SO₄; un'alternativa sono gli ultrasuoni, ma è sconsigliata per la possibile formazione di microplastiche da particelle grossolane [80];

- degradazione enzimatica: i campioni di microplastica possono essere trattati con una miscela di enzimi (lipasi, amilasi, proteinasi, chitinasi e cellulasi). È però un approccio nuovo, che necessita di ulteriori studi per dimostrarne la fattibilità nell'analisi di routine [81].

2.5.3 Campionamento del biota

Come già riportato, l'ingestione di microplastiche riguarda una grande varietà di specie, che rappresentano diversi livelli trofici. Riguardo all'ambiente marino, si va dai pesci, bivalvi e crostacei fino agli uccelli e ai mammiferi. La maggior parte dei campioni di pesci, crostacei e molluschi 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, a circuizione e da traino), in un range di profondità tra 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 o ossidativi, l'analisi del contenuto stomacale, delle branchie e dei tessuti. [82].

Il campionamento degli uccelli si basa invece sul recupero di esemplari morti, di solito da litorali o siti di nidificazione costiera. Il contenuto stomacale può contenere oggetti di plastica che coprono uno spettro di ampie dimensioni, mentre i tessuti tendono a contenere intervalli di dimensioni minori, in quanto le particelle più piccole hanno maggiori probabilità di essere trasferite dal tratto gastrointestinale [53].

2.6 Metodi di identificazione delle microplastiche

Una volta separate e purificate, le particelle plastiche devono essere identificate ed eventualmente quantificate. La caratterizzazione delle microplastiche può essere effettuata tramite l'applicazione di diversi metodi fisici o chimici [83], alcuni dei quali sono riportati in Figura 16. Un elemento spesso discriminante per la scelta del metodo da utilizzare sono le dimensioni dei frammenti polimerici (Figura 17).

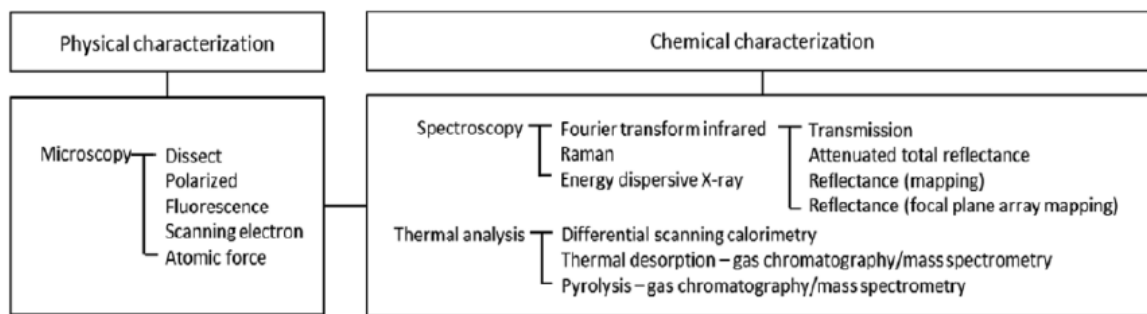


Figura 16: metodi di identificazione chimici e fisici attualmente utilizzati per l'analisi delle microplastiche [84]

2.6.1 Metodo visivo

L'identificazione può avvenire tramite osservazione dei campioni ad occhio nudo o con l'utilizzo di microscopi ottici, elettronici o a scansione di sonda. La quantificazione avviene tramite la conta manuale di tutti i microframmenti presenti. Sebbene la caratterizzazione visiva sia una tecnica veloce, semplice ed economica che può essere svolta anche in situ, i valori ottenuti non possono considerarsi affidabili, in quanto dipendono fortemente dall'operatore. La principale problematica sta nella difficoltà di distinzione tra particelle plastiche e non (come quarzo o parti animali e vegetali); restringere l'analisi dei campioni al solo metodo visivo porta quindi ad un'elevata frequenza di falsi positivi e/o negativi [84, 85]. Anche l'utilizzo di microscopi efficienti come i SEM non garantiscono una determinazione certa del tipo di polimero, e sono quindi raccomandati solo per casi specifici.

2.6.2 Metodo di tintura

Si tratta di un metodo di supporto all'identificazione visiva, che prevede il trattamento del campione con un colorante (come il rosa bengala o il Nile Red) che permetta la tintura di particelle organiche naturali (es: fibre di cellulosa). Il materiale non colorato viene così identificato come microplastico. Tuttavia anche questo è un metodo visivo, che non comporta l'assoluta certezza della natura sintetica delle particelle/fibre non colorate; deve perciò essere accoppiato ad altre tecniche, generalmente spettroscopiche [86]. Un altro svantaggio è la mancanza di informazioni sulla tipologia di plastica dei campioni. Si possono quindi ottenere solo conclusioni limitate sulla sorgente e il rischio ambientale del campione, poiché diversi tipi di plastica

presentano diversi gradi di tossicità derivanti dall'utilizzo di additivi, plastificanti e coloranti.

2.6.3 Spettroscopia FTIR e Raman

Rappresentano le due tecniche più comunemente utilizzate per la caratterizzazione delle microplastiche, ed infatti sono quelle raccomandate dall'MSFD dell'Unione Europea. Questi metodi richiedono basse quantità di campione e poche operazioni di preparazione; inoltre hanno il vantaggio di distinguere le particelle di plastica da quelle naturali, sia in campioni marini che di sedimenti.

- **Spettroscopia 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 [87]. È frequentemente utilizzata nell'analisi delle microplastiche (> 10 µm), grazie alla sua capacità di identificare i gruppi funzionali dei polimeri. La spettroscopia FTIR può essere utilizzata in tre modalità: trasmissione, riflessione e modalità di riflessione totale attenuata (ATR). L'ATR viene applicata per le microplastiche di dimensioni maggiori (> 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 con un'identificazione veloce e precisa [88]. 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 e permette di distinguere diversi tipi di polimeri nello stesso campione [89]. I principali disagi di questi metodi sono la procedura di scansione, molto dispendiosa in termini di tempo, la rappresentatività, la robustezza, la presenza di interferenze (acqua, materia organica, particelle, riflessioni, ecc.) e la preparazione richiesta del campione; risultano perciò difficili da implementare come analisi di routine.

- **Spettroscopia Raman**

Si tratta di una tecnica non distruttiva, frequentemente applicata per l'analisi delle microplastiche, anche di dimensioni inferiori a 1 µm. Tramite l'utilizzo di un laser il campione viene irradiato provocando diverse frequenze di luce. A seconda della

struttura molecolare e degli atomi presenti, si ottiene uno spettro unico per ogni polimero. Successivamente gli spettri vengono confrontati con degli standard [90]. Tramite questa analisi è possibile non solo identificare le materie plastiche, ma anche ottenere profili della composizione polimerica di ciascun campione. È possibile associare la spettroscopia Raman ad un microscopio ottico standard, e questo complesso prende il nome di micro-spettroscopia Raman (RM); i vantaggi di questa tecnica sono un'elevata risoluzione spaziale (fino ad 1 mm) e l'insensibilità all'acqua. Recentemente la RM è stata utilizzata ad esempio per esaminare la composizione delle particelle estratte da campioni di pesce essiccato, sospettate di essere microplastiche, permettendo l'identificazione del 59% di esse [91]. Una delle maggiori limitazioni della spettroscopia Raman è la degradazione del campione per esposizione UV, che porta a diminuzioni di intensità dei picchi (è il caso ad esempio del PVC); inoltre è una tecnica sensibile all'interferenza di fluorescenza di fondo da contaminazioni biologiche, organiche e inorganiche, che ostacolano l'identificazione; pertanto i campioni dovrebbero essere sottoposti ad una fase di purificazione prima dell'analisi [92].

Le spettroscopie Raman e FTIR possono essere utilizzate in modo complementare, in quanto la prima consente una miglior risposta ai legami simmetrici e non polari, mentre la seconda permette una migliore identificazione dei gruppi polari.

2.6.4 Metodi termici

Le tecniche termo-analitiche permettono di misurare i cambiamenti nelle proprietà fisiche e chimiche dei polimeri in funzione della loro stabilità termica. L'analisi termica fornisce un metodo alternativo alla spettroscopia per l'identificazione chimica di alcuni tipi di polimeri; tuttavia, si tratta di metodi distruttivi, che impediscono ulteriori analisi dei campioni microplastici. In questa categoria rientrano due tecniche: la pirolisi analitica e la termogravimetria.

- 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). Si tratta di una tecnica distruttiva che consente la caratterizzazione delle microplastiche in base ai prodotti di degradazione termica [93, 94], e può essere

utilizzata anche per l'identificazione simultanea di polimeri ed additivi associati [95]. Le singole particelle di polimero vengono pirolizzate in tubo di quarzo in condizioni inerti ad elevate temperature per intervalli di tempo brevi (ad esempio 700 °C per 10 secondi) [96]. 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. È anche possibile effettuare un'analisi di tipo quantitativo, costruendo una curva di calibrazione per i diversi polimeri. Questo metodo funziona molto bene per singoli pezzi e può essere applicato per campioni con massa fino a 0,5 mg, perciò richiede una preselezione delle singole particelle, ad esempio tramite tecniche ottiche. Il fatto di analizzare solo piccole quantità di campione tuttavia può in certi casi comportare problemi di rappresentatività del campione, soprattutto quando si trattano matrici complesse, non omogenee in piccola scala [97]. Inoltre questa analisi non riesce a distinguere le diverse tipologie dello stesso polimero (è il caso ad esempio dell'LDPE e dell'HDPE) [98]. Un ulteriore problema del metodo pirolitico sta nella sua sensibilità alle contaminazioni: in particolare durante la pirolisi, i prodotti di degradazione dei polimeri ad elevato peso molecolare (oltre 400 g/mol) vengono condensati nella transfert line tra il pirolizzatore e la GC-MS, che viene scaldato ad una temperatura massima di 400°C. ne consegue una manutenzione molto frequente. Nonostante ciò, il metodo è molto efficiente, e la velocità di misurazione lo rende molto utile per l'analisi di routine.

- 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, mantenendo il campione stesso in un'atmosfera gassosa controllata; permette la rilevazione di reazioni di ossidazione o decomposizione e di ottenere informazioni sulla composizione del materiale e sulla sua stabilità [99]. 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 di specifici polimeri direttamente in campioni ambientali, senza alcuna preselezione

o preparazione del campione. Si tratta di un metodo robusto, ideato per analizzare anche i campioni che rilasciano rilevanti quantità di composti ad elevata massa molecolare. Contrariamente alla Py-GC-MS, si possono trattare campioni con masse relativamente grandi (circa 200 volte superiori rispetto al metodo pirolitico); questo permette una migliore analisi di matrici complesse, non omogenee su piccola scala. È possibile combinare l'analisi termogravimetrica su estrattori a fase solida (TGA-SPE) e successiva analisi di questi adsorbitori tramite desorbimento termico, gas-cromatografia e spettrometria di massa (TDS-GC-MS); questa combinazione prende il nome di termo-estrazione a desorbimento accoppiata a gas-cromatografia e spettrometria di massa (TED-GC-MS) [100, 101].

I campioni ambientali, compresi i componenti organici e le microplastiche (fino a 20 mg) vengono collocati in un crogiuolo per TGA (solitamente in allumina) e pirolizzati in atmosfera inerte a temperatura controllata. I prodotti di degradazione rimangono intrappolati sugli adsorbitori a fase solida; successivamente si procede con il desorbimento in opportuno solvente, quindi con l'analisi con un sistema GC-MS, che rende possibile l'identificazione. Anche se si perdono le informazioni sulla distribuzione delle dimensioni, poiché le particelle polimeriche si fondono prima del degrado, il metodo può fornire misure veloci. Tuttavia 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 dimensionale delle microplastiche.

La TGA può anche essere accoppiata alla DSC (calorimetria differenziale a scansione) [102]; in questo modo è possibile svolgere analisi quali-quantitative di singoli polimeri e di miscele di due o più di essi, osservando i differenti comportamenti al variare della temperatura. Nonostante siano entrambe tecniche semplici e poco costose, sono usate più raramente nell'analisi di microplastiche.

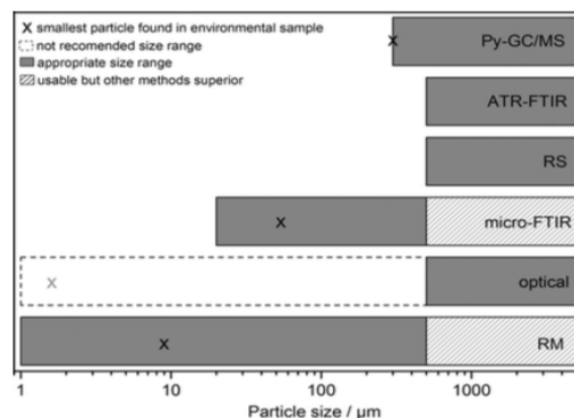


Figura 17: dimensioni delle microplastiche analizzabili tramite i diversi metodi di identificazione [69]

3. MATERIALI E METODI

La pirolisi analitica delle microplastiche è stata effettuata tramite due approcci differenti: in un primo momento è stato effettuato un metodo offline, dopodiché si è passato ad una tipologia online. Per entrambi sono stati analizzati sia singoli polimeri che miscele.

3.1 Materiali

In entrambi i casi l'analisi si è concentrata su tre differenti tipologie di polimeri:

- PS standard granulare (Mw: 382.100) (Sigma-Aldrich); sono state preparate due soluzioni di PS in toluene, a concentrazioni diverse a seconda del tipo di analisi (40 mg/mL per la pirolisi offline, 10 mg/mL per quella online). Da queste sono state prelevate differenti aliquote, in modo tale da analizzare diverse quantità di polimero, e sono state analizzate previa evaporazione del toluene. Questo metodo ha permesso di ridurre gli errori e di ottenere un miglior controllo delle masse prelevate;
- LDPE granulare;
- PET; in questo caso è stato utilizzato un campione reale, ovvero una bottiglia trasparente (per l'analisi offline) e un filo (per la pirolisi online).

Il metodo online è stato successivamente applicato a campioni di sabbia, prelevata in diversi punti sul litorale di Rimini.

3.2 Metodi di analisi pirolitica

3.2.1 Pirolisi offline

Il metodo offline permette di analizzare campioni di massa compresa tra 0,1 e 20 mg; il procedimento si è articolato in diversi passaggi:

- 1) Termogravimetria con adsorbimento dei prodotti di pirolisi gassosa su cartuccia

Per effettuare il trattamento pirolitico è stata utilizzata una TGA METTLER TOLEDO modello STDA851^e, dotata di microbilancia con portata pari a 20 mg e sensibilità di 0,001 mg. A tale scopo è stata messa a punto una programmata in flusso di azoto (90 ml/min):

- Riscaldamento da 30°C a 650°C, con una velocità di 100°C/min;
- Mantenimento a 650°C per due minuti.

La durata totale del metodo è di 8 minuti e 11 secondi.

L'analisi prevede la cattura dei fumi di pirolisi tramite una cartuccia SPE (solid phase extraction), la quale viene posta all'uscita della camera di pirolisi della TGA, come riportato in Figura 18. Sono state utilizzate cartucce ORBO™- 78. Carboxen® 564; Carbon Molecular Sieve (CMS) (400/200 mg) – 6 mm x 110 mm Supelco. I campioni sono stati inseriti nello strumento all'interno di microcuvette in allumina da 70 µL.



Figura 18: a sinistra, TGA; a destra, particolare della cartuccia SPE collocata all'uscita della camera di pirolisi.

2) Estrazione dei prodotti di degradazione

Al termine della pirolisi si è proceduto all'estrazione dei prodotti di pirolisi adsorbiti in fase solida: quest'ultima è stata estratta dalla cartuccia (mantenendovi tuttavia all'interno la parte di breakthrough) e inserita in una provetta, a cui è stato aggiunto 1 mL di toluene. Il motivo per cui la parte di breakthrough non è stata analizzata è che, da prove effettuate preliminarmente, non vi si sono riscontrate quantità apprezzabili di polimero.

Le provette sono state quindi sottoposte ad agitazione tramite agitatore rotante per un'ora, in modo tale da favorire l'estrazione, da parte del toluene, di tutti i composti adsorbiti.

Al termine dell'agitazione, il toluene è stato prelevato tramite pipetta Pasteur, e filtrato attraverso filtri per siringa con membrana in nylon (0.2 µm) e alloggiamento in

polipropilene (diam. 25 mm) - Whatman™. Il filtrato è stato quindi posto in vial da 1,5 mL, adatto all'auto-campionatore per l'analisi GC-MS. Ad ogni vial sono inoltre stati aggiunti 5 µL di standard interno (1,3,5 - tri-tertbutil benzene TTB, soluzione 1000 mg/L).

3) Analisi GC-MS

Le analisi sono state eseguite con un sistema Shimadzu GCMS-QP2010, con elio come fase mobile, mantenuto ad una velocità lineare costante di 35 cm/sec e fase stazionaria una colonna capillare 5% fenile e 95% polidimetilsilossano (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 è stata suddivisa nel modo seguente:

- Riscaldamento da 50°C a 100°C, alla velocità di 5°C/min;
- Riscaldamento fino a 290 °C alla velocità di 10°C/min;
- Mantenimento a 290°C per 1 minuto.

La durata totale dell'analisi è di 30 min. La durata del solvent-delay è di 5.50 min. La rivelazione MS viene effettuata con ionizzazione elettronica (EI) a 70 eV. Il volume di iniezione è 1 µL e l'iniezione è stata effettuata tramite autocampionatore.

Per ogni campione sono state effettuate due analisi: la prima in modalità full scan (da 35 a 350 unità di massa atomica), mentre la seconda, dopo l'analisi dei composti principali di pirolisi identificati, in modalità SIM (Single Ion Monitoring), al fine di concentrare le analisi sui prodotti identificati come target per ogni polimero.

3.2.2 Pirolisi online

Attraverso il metodo online è stato possibile analizzare quantità di polimeri minori rispetto al caso precedente, arrivando fino a 20 µg. Lo strumento utilizzato per questo processo è un pirolizzatore CDS Pyroprobe 5000 Series, Modello 5250. I campioni vengono inseriti in tubi di quarzo, precedentemente condizionati in muffola a 600°C, e mantenuti in posizione tramite fibra di quarzo o una porzione di filtro (sono stati utilizzati filtri in quarzo 1.2 µm, diam. 47mm, type R-100 SKC inc.). Vengono quindi portati all'interno della camera di pirolisi, mantenuta in flusso di He, e sottoposti al trattamento termico. Per mezzo di una transfert line riscaldata, i prodotti di pirolisi sono direttamente iniettati nel GC. La strumentazione utilizzata è riportata in Figura 21.



Figura 21: pirolizzatore utilizzato per l'analisi online, collegato al GC-MS tramite la transfert line

La temperatura della valvola della camera di pirolisi è stata settata a 200°C, mentre quella della transfert line a 290°C, per evitare la condensazione al suo interno dei prodotti di pirolisi. La programmata termica invece è stata così suddivisa:

- Riscaldamento a 600°C, con velocità pari a 20°C/mSec; la temperatura è stata poi mantenuta costante per 60 secondi;
- Mantenimento della temperatura a 600°C per ulteriori 20 secondi.

L'analisi in MS è stata invece effettuata solo nella configurazione full scan, in modalità split nell'intervallo 35-350 m/z.

La programmata termica del GC è la seguente:

- Riscaldamento da 50°C a 280°C, alla velocità di 20°C/min;
- Mantenimento a 280°C per 2 minuti.

La durata totale dell'analisi è pari a 13,5 minuti. La durata del solvent delay è di un minuto, mentre l'analisi MS è stata effettuata con ionizzazione elettronica (EI) a 70 eV, come nel caso precedente. Per ogni polimero analizzato sono stati scelti come prodotti di pirolisi target gli stessi dell'analisi offline.

3.3 Calibrazione

Al fine di poter svolgere un'analisi anche di tipo quantitativo, in entrambi i casi sono state preparate delle rette di calibrazione per ogni polimero. Per il polistirene si è proceduto prelevando diverse quantità della soluzione in toluene e depositandole

nella cuvetta o sul filtro in quarzo, rispettivamente per il metodo offline e online. Una volta evaporato il toluene si è quindi proceduto con la pirolisi. I campioni di polietilene e polietilentereftalato sono invece stati presi in forma solida e pesati tramite la microbilancia della TGA, quindi sottoposti al trattamento termico.

3.4 Metodo di analisi dei campioni ambientali

3.4.1 Campionamento della sabbia

Non esiste tuttora un metodo ufficiale per il campionamento della sabbia; si è quindi proceduto con quello più comunemente riportato in letteratura [103, 104]. I campioni sono stati prelevati lungo dei transetti perpendicolari alla linea di costa, in tre diversi punti: presso il mare, a metà della spiaggia e sul fondo di essa. Il prelievo è stato effettuato fino a 5 cm di profondità, utilizzando un cucchiaino metallico per evitare contaminazioni.

Il campionamento è avvenuto in due periodi differenti: inizio ottobre (ovvero al termine della stagione balneare) e fine novembre; nel primo caso i campioni sono stati prelevati lungo un solo transetto, mentre nel secondo lungo due transetti posti a circa 20 m di distanza l'uno dall'altro.

3.4.2 Separazione e analisi delle microplastiche

Ogni frazione di sabbia raccolta è stata innanzitutto sottoposta ad un ciclo di 24 ore in stufa a 60°C, in modo tale da eliminare la maggior quantità d'acqua possibile; al termine dell'essiccamento, da ogni campione, dopo omogeneizzazione tramite rimescolamento, è stata prelevata un'aliquota da 100 g, su cui sono state svolte le analisi. Ad ogni aliquota è stata aggiunto 1 L di soluzione satura di NaCl, ottenuta sciogliendo 357 g di sale (è stato utilizzato il comune sale da cucina) in 1 L di acqua. Il miscuglio sabbia – soluzione salina è stato quindi sottoposto ad agitazione meccanica per 4 ore, utilizzando a questo scopo un agitatore a pale in teflon (Figura 24); al termine dell'agitazione si è lasciato sedimentare la sabbia per una notte. In questo modo si è ottenuta una separazione per densità dei frammenti polimerici: PE e PS, meno densi rispetto alla soluzione salina, rimangono in superficie. Questo metodo non si applica ai frammenti di PET, la cui densità richiederebbe l'utilizzo di un diverso sale. Nelle analisi della sabbia quest'ultimo polimero è stato quindi tralasciato.

Una volta sedimentata la sabbia, la soluzione è stata prelevata tramite pipetta di Pasteur, quindi filtrata sotto vuoto su membrane in quarzo. Terminata questa operazione, i filtri sono stati lasciati 10 minuti in stufa a 40 °C per eliminare l'umidità rimanente, quindi la parte superiore, su cui presumibilmente si sono depositati i frammenti più grossolani di polimero, è stata attentamente separata dal resto della membrana, inserita all'interno dei tubi in quarzo e sottoposta a Py-GC-MS. Il metodo pirolitico e il programma dell'analisi GC-MS sono gli stessi utilizzati per l'analisi online dei polimeri.



Figura 24: sistema di agitazione meccanica della sabbia

4. DISCUSSIONE

La prima parte del lavoro di tesi ha riguardato la valutazione di un metodo per la determinazione delle microplastiche tramite pirolisi analitica, sia offline che online; a tal fine sono state preventivamente costruite delle rette di calibrazione dei tre polimeri in esame (PS, PE e PET), quindi sono state analizzate delle miscele binarie e ternarie di essi, per valutare la presenza o meno di eventuali interferenze tra i segnali dei diversi polimeri. Questo è stato effettuato per entrambi i metodi.

La scelta dei polimeri da analizzare è stata effettuata principalmente sulla base della loro abbondanza tra le microplastiche nell'ambiente. PS, PE e PET sono infatti tra i polimeri maggiormente presenti in questa tipologia di inquinanti, in particolar modo nelle sabbie [105, 106].

Per l'analisi del polistirene è stato utilizzato un polimero standard, in quanto questo lavoro di tesi si pone in continuità con uno studio precedente di pirolisi analitica su campioni biologici riguardante questo polimero. Riguardo gli altri due polimeri invece, per le analisi si è preferito usare campioni di polimeri commerciali invece che in forma standard, per valutare al meglio la risposta pirolitica che potrebbe essere influenzata dalla presenza di cariche o di altri additivi.

4.1 Analisi preliminari

La prima operazione effettuata ha consistito nella valutazione della risposta analitica del metodo pirolitico, sia offline che online. A tal fine i campioni dei tre polimeri sono stati sottoposti a pirolisi analitica, secondo le metodologie descritte precedentemente. Al termine delle analisi, dai cromatogrammi ottenuti sono stati identificati i prodotti di pirolisi maggiormente caratterizzanti i polimeri in esame, su cui ci si è basati per tutte le analisi svolte successivamente.

4.1.1 Analisi offline

In Figura 26 sono riportati i cromatogrammi in modalità SIM relativi a PS, PE e PET, che presentano i principali prodotti di pirolisi, tra cui quelli selezionati come target per le analisi successive.

Le caratteristiche dei prodotti target sono invece riportate in Tabella 2.

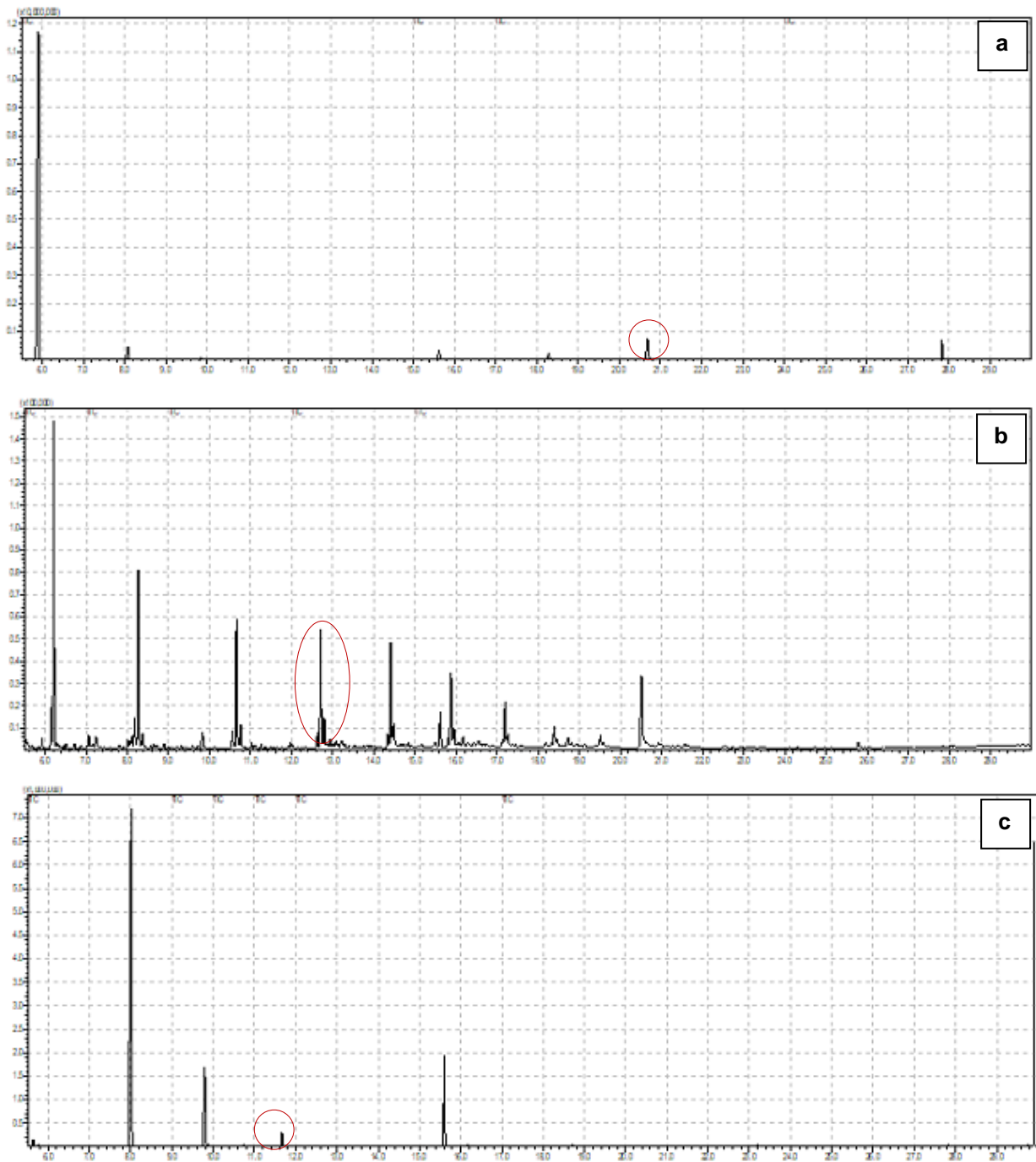


Figura 26: a) cromatogramma del PS; b) cromatogramma del PE; c) cromatogramma del PET. In rosso sono cerchiati i picchi dei prodotti di pirolisi individuati come target

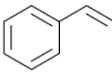
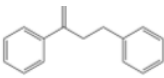
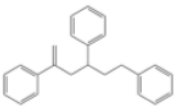

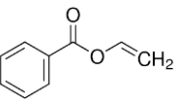
Il cromatogramma del polistirene mostra un picco molto elevato relativo al monomero, mentre dimero e trimero, seppur visibili, hanno un segnale minore. Tuttavia lo stirene non può essere considerato un marker affidabile per esaminare la presenza del polimero nelle analisi ambientali, perciò non è stato scelto come

frammento target. La scelta è quindi ricaduta sul 2,4-difenil-1-butene (stirene dimero), poiché presenta un segnale migliore rispetto al trimero.

Il cromatogramma del polietilene è caratterizzato dalla presenza di picchi tripli, dei quali il centrale presenta maggiore intensità. Questi tripletti vengono considerati una sorta di “impronta digitale” del PE, e corrispondono a tre prodotti di degradazione caratteristici: il primo agli alcani, il secondo (più intenso) agli alcheni, il terzo ai dieni.

Il cromatogramma del PET è invece più complesso, a causa della tipologia di campione utilizzato. L'unico picco identificato con certezza come prodotto di degradazione del polimero, confrontando i segnali ottenuti con quanto riportato in letteratura, è il vinil benzoato.

Tabella 2: frammenti target, tempi di ritenzione e rapporto m/z presi in considerazione per i diversi polimeri.

POLIMERO	PRINCIPALI PRODOTTI DI PIROLISI	FORMULA	t _{ritenzione} /[min]	m/z
PS	Stirene		5,892	51-78-104
	2,4-difenil-1-butene (stirene dimero)		20,675	91-130-208
	2,4,6- trifenil-1-esene (stirene trimero)		27,817	91-130-207
PE	1-tridecene		12,700	55-69-112
PET	Vinil benzoato		11,692	51-77-105

In Figura 27 sono riportati anche gli spettri di massa dei prodotti di pirolisi scelti come target nelle analisi.

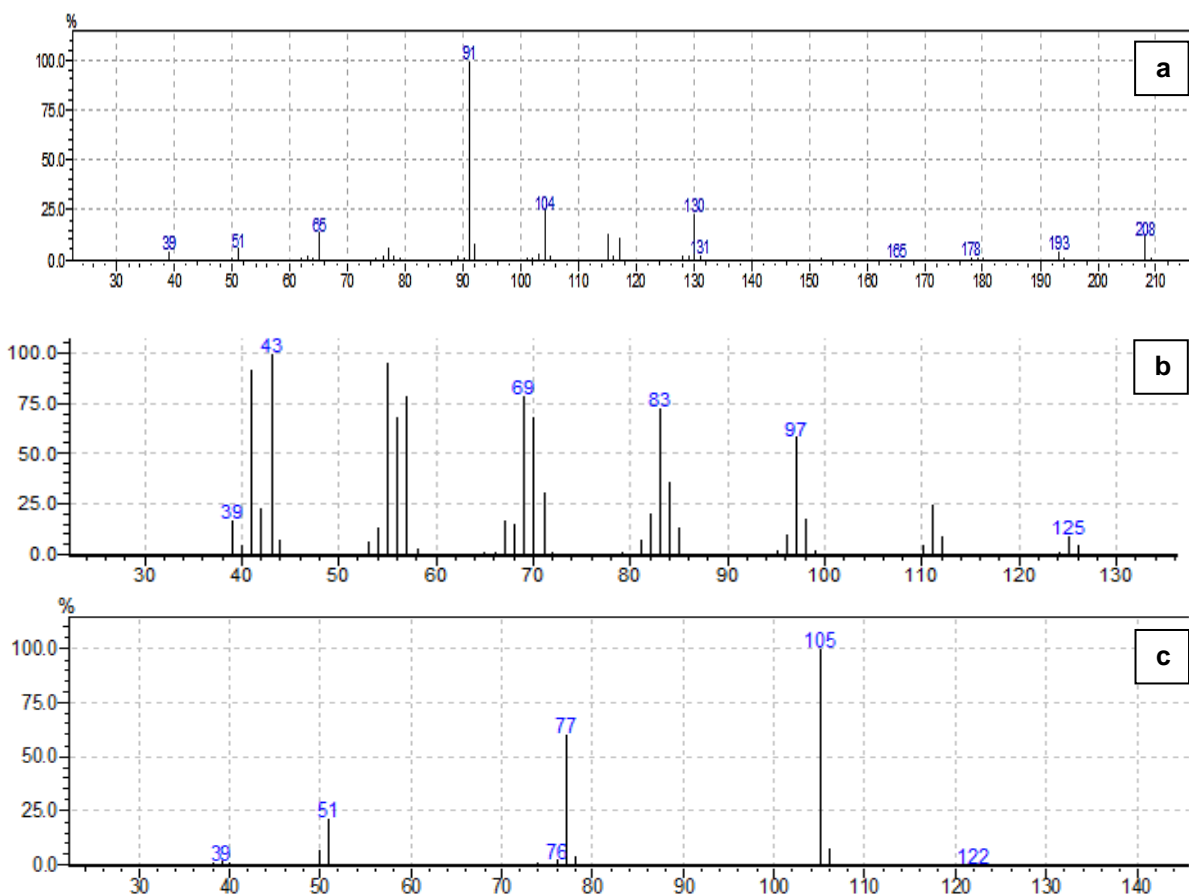
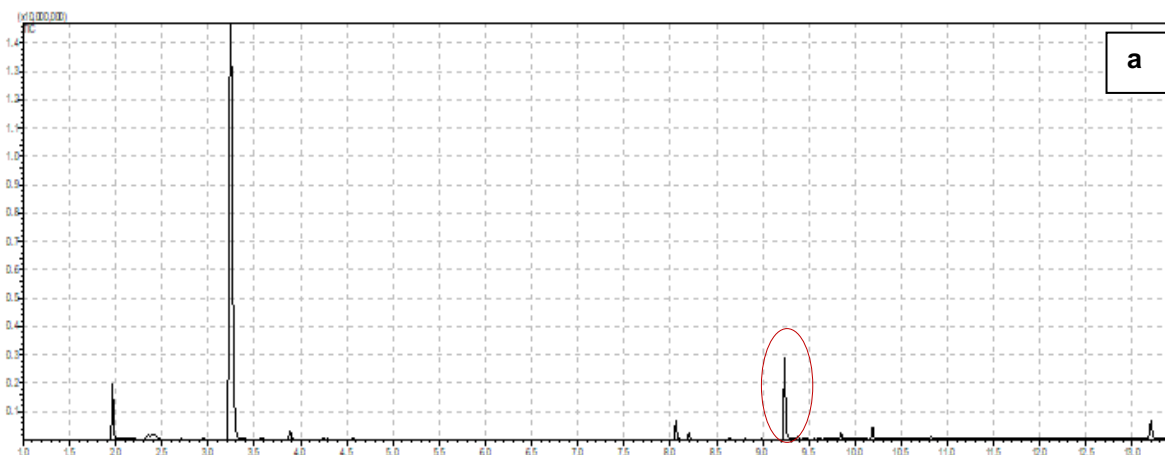


Figura 27: spettri di massa dei prodotti target: a) 2,4-difenil-1-butene; b) 1-tridecene; c) vinil benzoato

4.1.2 Analisi online

Nell'analisi online sono stati scelti come prodotti di pirolisi target gli stessi dell'analisi offline, ovvero il 2,4-difenil-1-butene ($t_{ritenzione} = 9,233$ min) per il PS, l'1-tridecene ($t_{ritenzione} = 6,150$ min) per il PE e il vinil benzoato ($t_{ritenzione} = 5,183$ min) per il PET. Di seguito sono riportati i tre cromatogrammi in modalità TIC. La maggiore sensibilità del metodo ha infatti permesso di svolgere analisi in questa modalità.



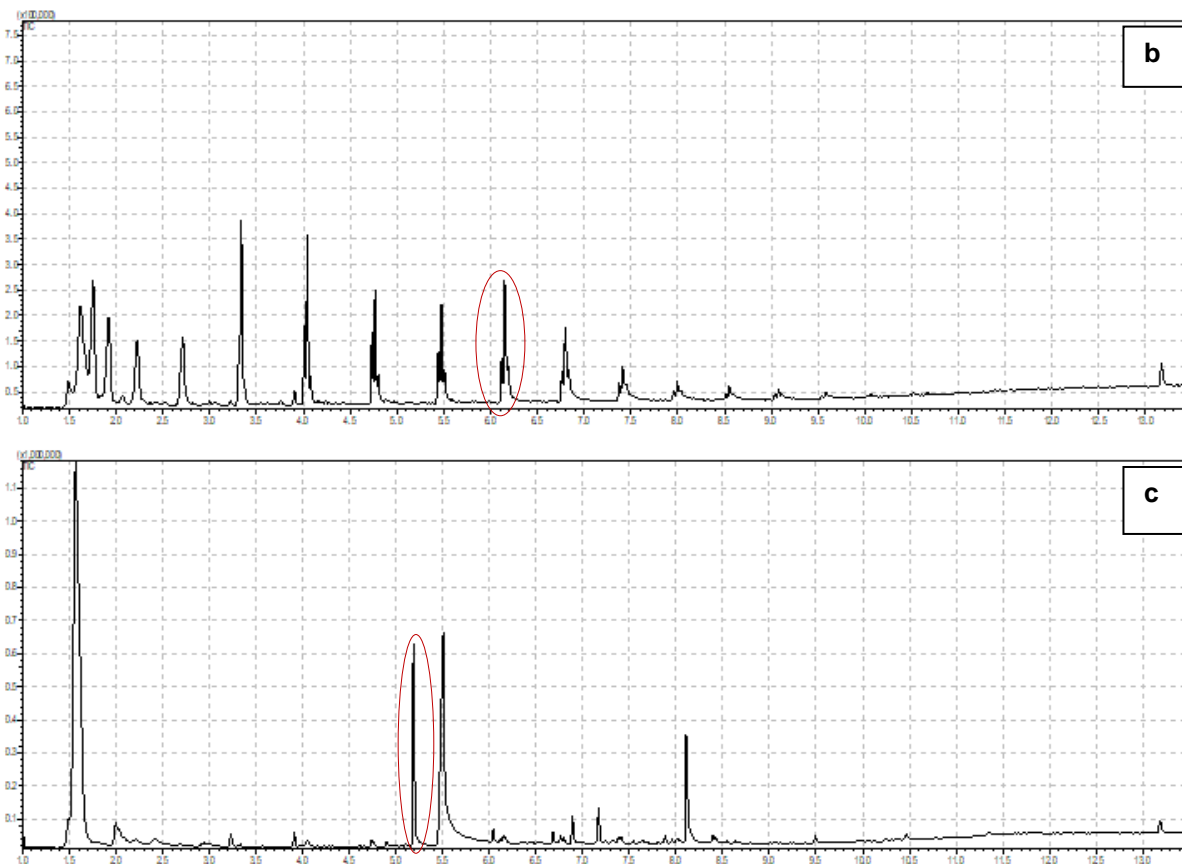


Figura 28: a) cromatogramma del PS; b) cromatogramma del PE; c) cromatogramma del PET. In rosso sono cerchiati i frammenti target.

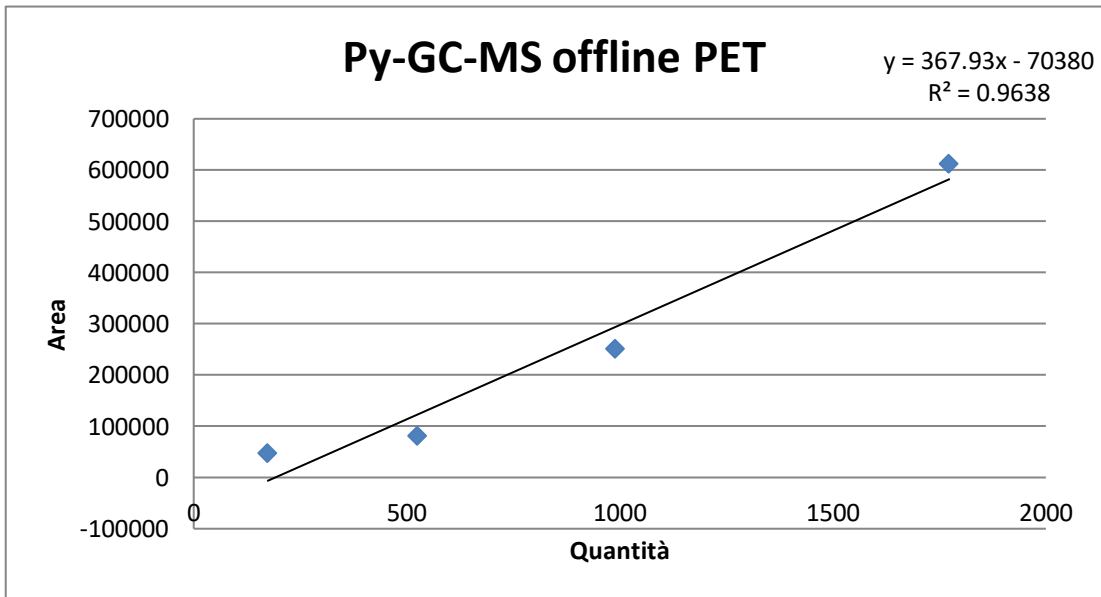
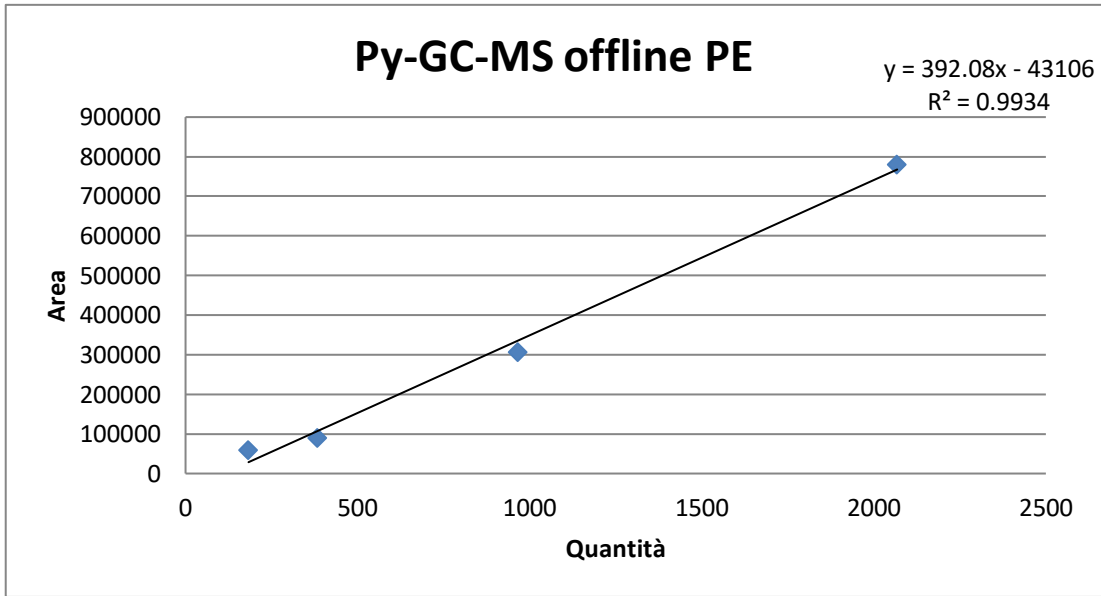
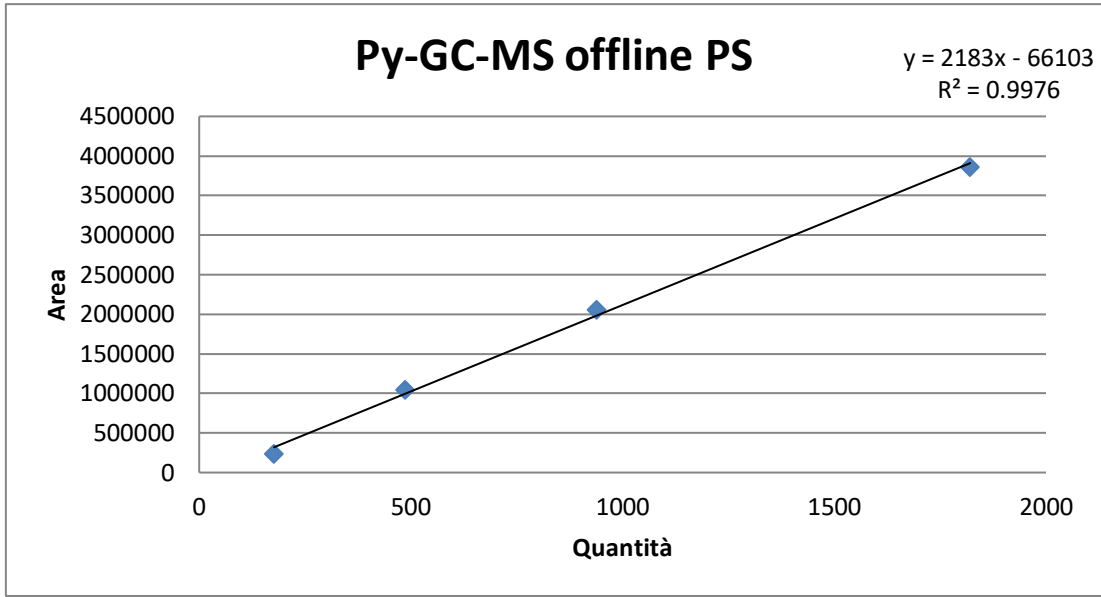
Dopo le analisi preliminari, valutate le risposte dei tre polimeri al trattamento pirolitico offline e online, si è proceduto con le analisi successive, osservando il comportamento dei prodotti di pirolisi selezionati come target.

4.2 Costruzione delle rette di calibrazione

4.2.1 Pirolisi offline

Le rette di calibrazione sono state costruite per ogni polimero, prendendo in considerazione l'area del composto target identificato con lettura SIM in MS. In tutti e tre i casi sono state analizzate quattro diverse quantità di polimeri, in un range compreso tra 0,150 e 2,100 mg. In particolare, il limite inferiore è stato valutato come limite di quantificazione, poiché al di sotto di esso i valori di deviazione standard sono risultati troppo elevati.

Di seguito sono riportate le rette di calibrazione dei tre polimeri, insieme alle relative equazioni e ai coefficienti di correlazione.



Come si può notare dai grafici, l'area dei picchi nei cromatogrammi in funzione della quantità di polimero analizzata segue un andamento di tipo lineare. Le caratteristiche delle rette, così come le diverse quantità di polimeri analizzate, sono riportate in Tabella 3.

Tabella 3: quantità analizzate e risultati della calibrazione dei polimeri con metodo offline

Polimero	Quantità (mg)				Equazione retta	R ²
PS	0,177	0,486	0,938	1,182	$y = 2183x - 66103$	0,9976
PE	0,183	0,383	0,966	2,068	$y = 392,08x - 43106$	0,9934
PET	0,174	0,525	0,989	1,773	$y = 367,93x - 70380$	0,9638

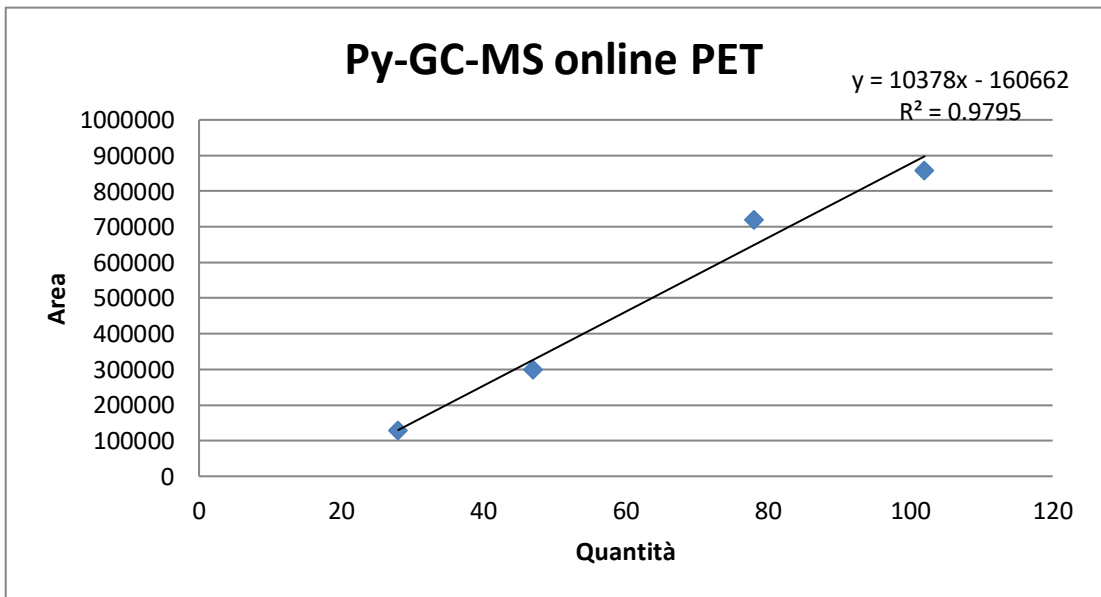
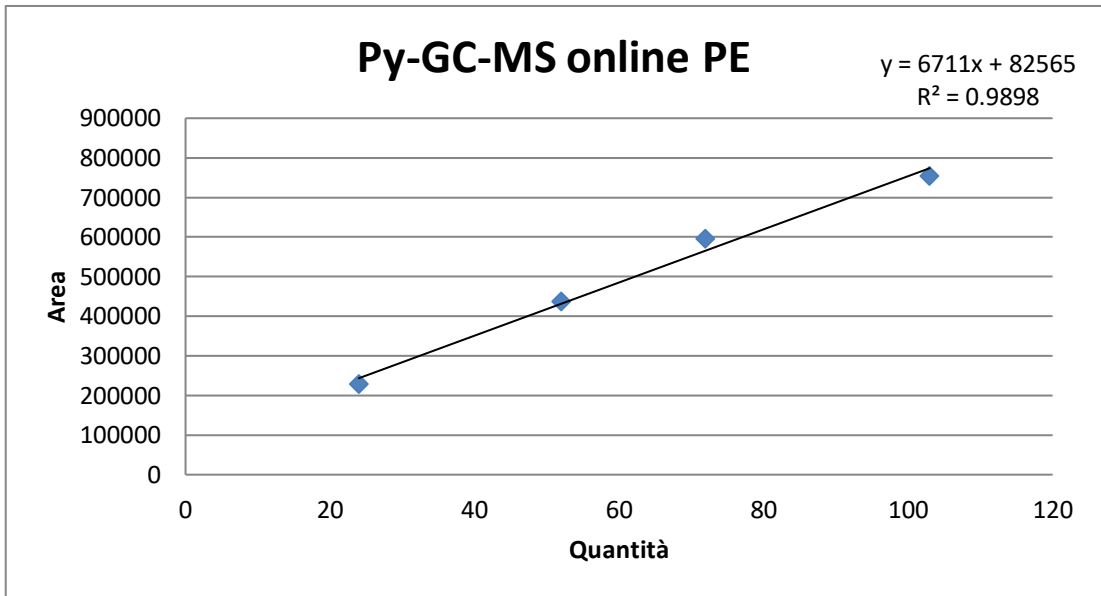
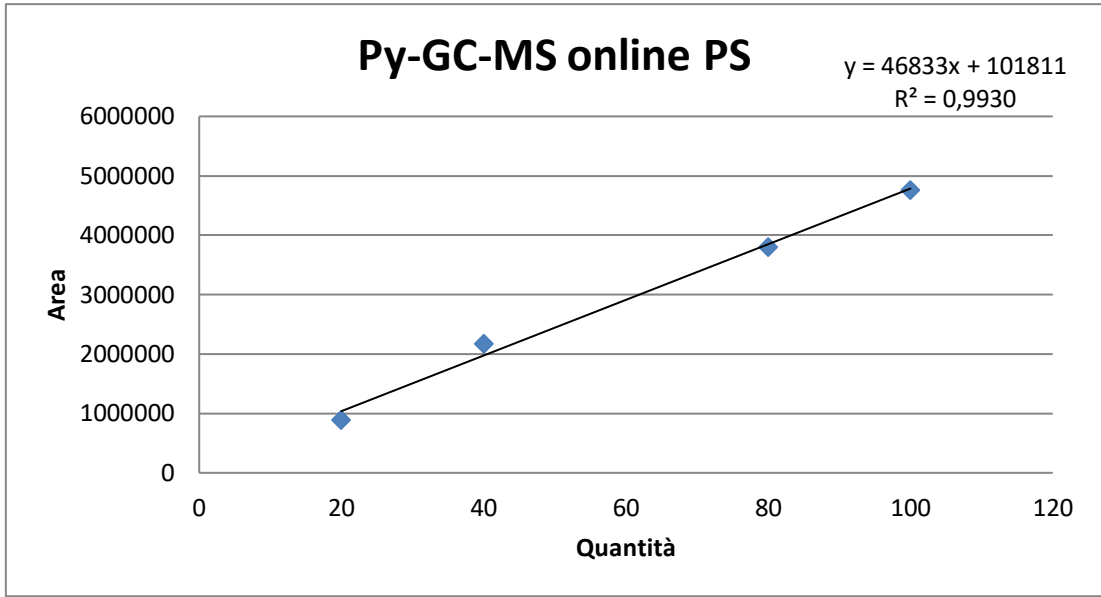
Osservando i risultati della calibrazione si nota una buona linearità sia nel caso del polistirene che del polietilene; i coefficienti di correlazione sono elevati. Nel caso del PET, invece, la retta mostra un coefficiente di correlazione più basso; ciò è dovuto ad uno scostamento dalla linearità alle concentrazioni più basse. Eliminando il punto corrispondente alla quantità minore si nota infatti un deciso miglioramento della linearità, con un coefficiente di correlazione pari a 0,9967.

Le quantità analizzabili attraverso la pirolisi analitica offline consentono quindi di ottenere rette di calibrazione caratterizzate da risposte di tipo lineare. Tuttavia, le quantità di microplastiche che ci si aspetta di trovare nei campioni ambientali sono sotto all'intervallo di linearità della risposta; perciò si è proceduto effettuando anche le analisi in modalità online.

4.2.2 Pirolisi online

La pirolisi online permette di aumentare la risposta analitica, per cui pur mantenendo le stesse condizioni di quantificazione si è proceduto alla costruzione di curve con aliquote di campione molto inferiori, con un intervallo compreso tra i 20 e i 100 µg.

Le rette di calibrazione sono riportate di seguito, mentre in Tabella 4 sono riassunte le informazioni relative alle analisi, le equazioni delle rette e i valori di R².



Polimero	Quantità (µg)				Equazione retta	R ²
PS	20	40	80	100	$y = 46833x + 101811$	0,9930
PE	24	52	72	103	$y = 6711x + 82565$	0,9898
PET	28	47	78	102	$y = 10378x - 160662$	0,9795

Tabella 4: quantità di polimeri analizzate, equazioni delle rette di calibrazione e valori di R² delle prove in modalità online.

Come si può notare dalle rette, anche nelle analisi in modalità online, seppur analizzando frammenti di massa minore, si ottengono delle risposte caratterizzate da andamenti di tipo lineare. In tutti e tre i casi le rette mostrano dei coefficienti di correlazione soddisfacenti per questa tipologia di analisi.

Il PS mostra sempre i migliori risultati. Questo può essere anche imputato all'utilizzo di standard in soluzione che sono più facili da dosare rispetto agli altri polimeri ricavati da frammenti pesati. Inoltre in pirolisi online, pur diminuendo la quantità analizzata, si ottengono risultati comparabili o migliori di quella offline. Chiaramente, il passaggio intermedio di adsorbimento dei prodotti di decomposizione in cartuccia e successiva estrazione, aumenta nel metodo offline gli errori dovuti ad un'estrazione incompleta. Col metodo online tutti i prodotti di pirolisi passano direttamente all'iniettore del GC-MS, con una minore possibilità di errori durante i passaggi intermedi.

4.3 Valutazione delle possibili interferenze nell'analisi di miscele polimeriche

Una volta costruite le rette di calibrazione dei polimeri presi in esame, ci si è concentrati sulla pirolisi analitica di miscele binarie e ternarie di questi. Lo scopo di questo tipo di analisi è stato quello di valutare la possibile presenza di interferenze quando si vanno ad analizzare miscele polimeriche rispetto ai polimeri presi singolarmente. Nei campioni ambientali infatti non è mai presente un solo polimero, ma diverse tipologie. Il processo di pirolisi infatti, è un processo di degradazione termica che è influenzata da vari fattori (velocità di riscaldamento, eventuali additivi, composti organici, possibile presenza di catalizzatori, come i cloruri). Per cui la presenza di più polimeri potrebbe comportare la formazione di nuovi prodotti, e/o reazioni competitive che si traducono in una variazione del segnale pirolitico degli

ioni target. Questo aspetto è importante al fine di poter svolgere analisi non solo di tipo qualitativo, ma anche semi quantitativo delle microplastiche in ambiente.

Sono state quindi preparate diverse miscele, contenenti i diversi polimeri in quantità note (per comodità sono stati scelti punti posti a metà delle rette di calibrazione), e sono state sottoposte a pirolisi analitica, osservando la variazione del valore dell'area dei picchi dei frammenti target rispetto al valore atteso. Basandosi su quanto riportato in letteratura, i risultati sono stati considerati all'interno dell'errore sperimentale se non si discostano di più del 20% dal valore effettivamente pesato [107; 108].

4.3.1 Pirolisi offline

Attraverso la metodologia offline è stata effettuata una prova solo su una miscela binaria composta da PS e PE. L'intento principale è stato infatti quello di osservare se si verificassero eventuali interferenze, per poi scendere a quantità minori, più rappresentative quantitativamente dal punto di vista delle microplastiche in ambiente.

A tale scopo, in una cuvetta in allumina per TGA sono stati inseriti dapprima 0,700 mg di PS in toluene quindi, dopo evaporazione del solvente a 110°C, 0,750 mg di PE. La miscela è stata quindi sottoposta a pirolisi analitica offline e successiva analisi GC-MS, seguendo la metodica riportata precedentemente. Dal cromatogramma ottenuto (Figura 29) sono state identificate le aree dei picchi dei due frammenti target dei polimeri in esame ed inserite nell'equazione della retta di calibrazione.

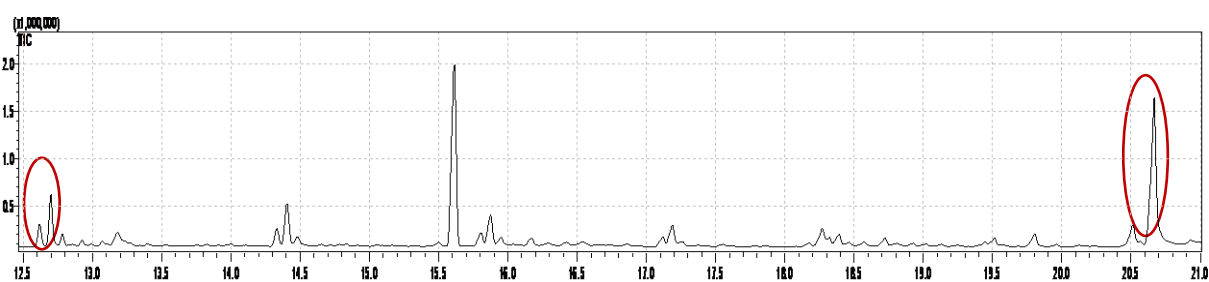


Figura 29: sezione del cromatogramma della miscela offline. In rosso sono cerchiati i picchi dei prodotti target.

Sono state quindi calcolate le quantità corrispondenti di entrambi i polimeri:

- PS: 0,984 mg;
- PE: 0,617 mg.

Si può notare la divergenza tra la quantità reale di polimero sottoposta al trattamento termico e quella calcolata in base all'area del picco del frammento target, sia per il polistirene che per il polietilene, con uno scostamento del 41% in più nel primo caso e del 18% in meno nel secondo. Mentre l'errore nella misura del PE rientra comunque nell'errore sperimentale, quello del PS è di gran lunga maggiore. Una possibile causa potrebbe stare nella tipologia di metodo: i diversi passaggi, e in particolare la procedura di estrazione dei prodotti di pirolisi dalla cartuccia SPE, potrebbero portare ad una lettura non conforme con quanto ci si aspetta. Tuttavia la causa più probabile di questo scostamento potrebbe essere il fatto che il PS, quando si trova in miscela con altri polimeri, subisce delle interferenze che vanno a falsare il risultato, portando a difficoltà nello svolgimento di analisi di tipo quantitativo.

Non sono quindi state effettuate ulteriori prove in modalità offline, preferendo concentrarsi maggiormente su quella online, per osservare se questo comportamento si verifica anche in presenza di quantità minori di polimeri, maggiormente distribuite (si trovano infatti all'interno del tubo in quarzo, meno in contatto rispetto alla cuvetta della TGA), senza passaggi tra il trattamento pirolitico e l'analisi GC-MS e con una velocità di riscaldamento maggiore.

4.3.2 Pirolisi online

Tramite il metodo online sono state effettuate le analisi per la valutazione delle interferenze su quattro diverse miscele polimeriche: tre binarie (PS+PE; PS+PET; PE+PET) e una ternaria (PS+PE+PET); per ogni miscela sono state effettuate tre prove, in modo tale da osservare la riproducibilità delle analisi. Come per le precedenti prove, le quantità analizzate di ogni polimero sono state scelte circa a metà delle rette di calibrazione, ossia 60 µg.

Dapprima è stata depositata su una piccola frazione di filtro in quarzo un'aliquota della soluzione di PS in toluene; in seguito all'evaporazione del solvente il filtro è stato inserito all'interno del tubo di pirolisi, a cui sono stati aggiunti i frammenti solidi degli altri due polimeri. Per le analisi delle miscele binarie PE+PET i frammenti polimerici sono invece stati inseriti all'interno dei tubi utilizzando come supporto una pallina di lana di quarzo. Di seguito sono riportati i cromatogrammi delle diverse miscele ed i risultati delle prove, in termini di aree dei picchi dei frammenti target, insieme ai valori medi, alle deviazioni standard e agli RSD (deviazioni standard relative).

❖ *Miscela PS+PE*

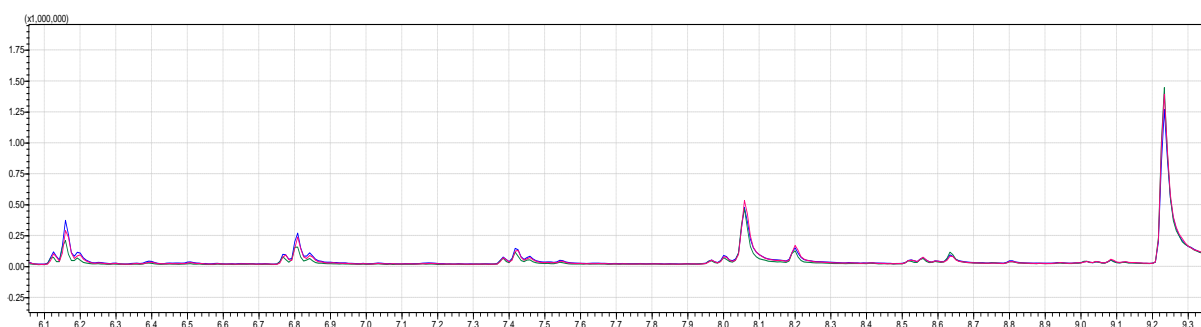


Figura 30: confronto dei tre cromatogrammi della miscela PS+PE

Frammento	#1	#2	#3	media	dev st.	RSD
2,4-difenil-1-butene	$4,1 \cdot 10^6$	$3,0 \cdot 10^6$	$3,2 \cdot 10^6$	$3,4 \cdot 10^6$	$5,8 \cdot 10^5$	17%
1-tridecene	$5,0 \cdot 10^5$	$9,8 \cdot 10^5$	$4,6 \cdot 10^5$	$6,5 \cdot 10^5$	$3,0 \cdot 10^5$	45%

Osservando i risultati delle analisi si nota che i valori delle aree dei picchi variano molto da una prova all'altra, come testimoniato dalle elevate deviazioni standard. Gli RSD sono infatti pari al 17% per il dimero dello stirene e al 45% per l'1-tridecene. Inserendo i valori medi nelle equazioni delle rette e calcolando le quantità corrispondenti si ottengono i seguenti valori:

- PS: 71 µg;
- PE: 84 µg.

Rispetto alle quantità realmente sottoposte ad analisi si osservano delle divergenze in entrambi i casi. Più precisamente, si ha uno scarto del 18% per il PS (all'interno dell'errore sperimentale), mentre per il PE l'errore è molto più elevato (40%).

❖ *Miscela PS+PET*

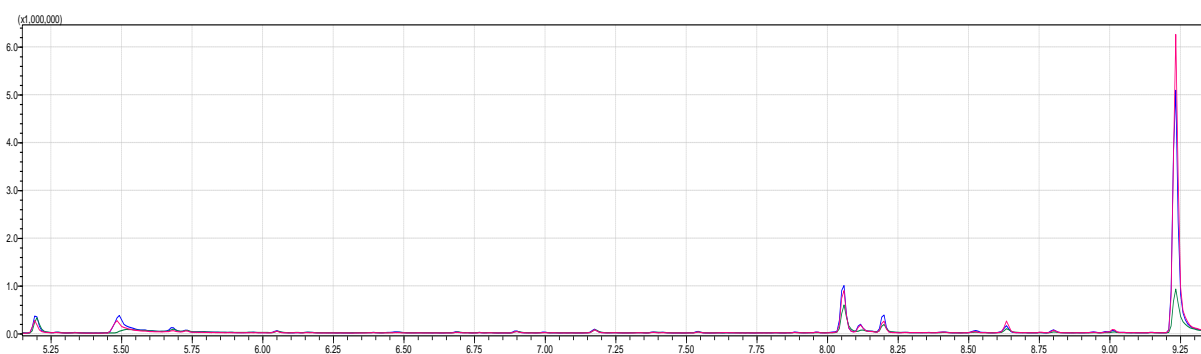


Figura 31: confronto dei tre cromatogrammi della miscela PS+PET

Frammento	#1	#2	#3	media	dev st.	RSD
2,4-difenil-1-butene	$2,0 \cdot 10^6$	$7,2 \cdot 10^6$	$1,2 \cdot 10^7$	$7,0 \cdot 10^6$	$5,0 \cdot 10^6$	71%
vinil benzoato	$4,9 \cdot 10^5$	$5,5 \cdot 10^5$	$6,5 \cdot 10^5$	$5,6 \cdot 10^5$	$8,2 \cdot 10^4$	15%

Anche in questo caso si può osservare una notevole variazione nei valori delle aree dei picchi tra una prova e l'altra. In particolare, per il 2,4-difenil-1-butene i risultati divergono completamente (con un RSD pari al 71%). I valori ottenuti per questo composto non possono quindi essere considerati attendibili. Per capire il motivo di questo andamento sono stati osservati gli spettri dei bianchi effettuati tra un'analisi e l'altra al fine di rimuovere eventuali prodotti rimasti nella *transfert line*. In ogni bianco si è effettivamente notata la presenza del picco relativo al dimero dello stirene, con un'intensità non trascurabile. È stato quindi ipotizzato che il 2,4-difenil-1-butene non riesca a passare completamente dal pirolizzatore alla GC-MS, ma rimanga in parte intrappolato nella *transfert line*, nonostante l'elevata temperatura (290°C).

Per quanto riguarda il PET, invece, la quantità corrispondente all'area media del picco è pari a 70 µg, con uno scarto dal valore reale (+17%) che rientra nell'errore sperimentale.

❖ Miscela PE+PET

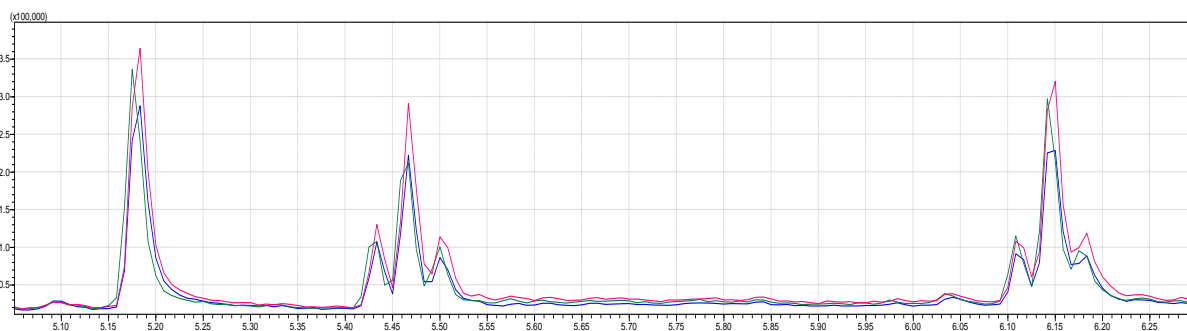


Figura 32: confronto dei tre cromatogrammi della miscela PE+PET

Frammento	#1	#2	#3	media	dev st.	RSD
1-tridecene	$6,0 \cdot 10^5$	$3,2 \cdot 10^5$	$4,3 \cdot 10^5$	$4,5 \cdot 10^5$	$1,4 \cdot 10^5$	32%
vinil benzoato	$5,0 \cdot 10^5$	$4,9 \cdot 10^5$	$5,8 \cdot 10^5$	$5,2 \cdot 10^5$	$5,1 \cdot 10^4$	10%

Come nelle prove delle altre miscele binarie, anche per questa si riscontrano valori diversi tra un'analisi e l'altra, specialmente nel caso dell'1-tridecene, che presenta un

valore di RSD pari al 32%. Per il vinil benzoato, invece, il valore di RSD rimane nell'intervallo di accettabilità (10%), per cui l'analisi può essere considerata riproducibile. Le quantità dei due polimeri ottenute inserendo i valori medi delle aree nelle rette di calibrazione sono i seguenti:

- PE: 55 µg;
- PET: 66 µg.

I due valori non si discostano in maniera significativa dalle quantità reali sottoposte al trattamento pirolitico, rimanendo ampiamente all'interno dell'errore sperimentale.

❖ *Miscela PS+PE+PET*

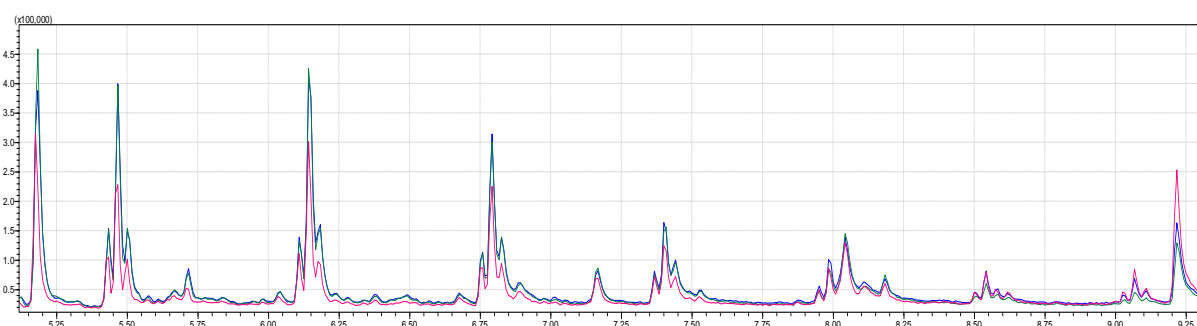


Figura 33: confronto dei tre cromatogrammi della miscela PS+PE+PET

Frammento	#1	#2	#3	media	dev st.	RSD
2,4-difenil-1-butene	$2,8 \cdot 10^5$	$3,4 \cdot 10^5$	$5,7 \cdot 10^5$	$3,9 \cdot 10^5$	$1,5 \cdot 10^5$	39%
1-tridecene	$5,8 \cdot 10^5$	$5,9 \cdot 10^5$	$6,0 \cdot 10^5$	$5,9 \cdot 10^5$	$1,2 \cdot 10^4$	2%
vinil benzoato	$7,4 \cdot 10^5$	$7,0 \cdot 10^5$	$4,7 \cdot 10^5$	$6,4 \cdot 10^5$	$1,5 \cdot 10^5$	23%

Per quanto riguarda le analisi delle miscele ternarie, continua a manifestarsi una variabilità nei valori delle aree dei picchi dei frammenti target; solo l'1-tridecene infatti mostra una buona riproducibilità delle analisi, con un valore di RSD accettabile (2%). Per gli altri due frammenti si ottengono valori molto maggiori, pari al 39% per il 2,4-difenil-1-butene e al 23% per il vinil benzoato.

Osservando i bianchi effettuati in seguito ad ogni prova, si continua a notare il picco relativo al dimero dello stirene, fatto che tende a confermare quanto ipotizzato precedentemente, ovvero che questo composto, in miscela con altri polimeri, non riesce a raggiungere completamente la GC-MS.

Sulla base dei valori medi delle aree dei picchi, le quantità calcolate dei tre polimeri sono le seguenti:

- PS: 6 µg;
- PE: 76 µg;
- PET: 77 µg.

Tutti e tre i polimeri differiscono rispetto alle quantità pesate, con scarti superiori all'errore sperimentale. In particolare, il PS mostra un valore calcolato totalmente falsato rispetto a quello reale.

L'analisi di miscele polimeriche, effettuata sia offline che online, ha permesso quindi di evidenziare delle notevoli divergenze nella risposta alla pirolisi analitica dei tre polimeri in esame rispetto a quando vengono analizzati singolarmente. L'unica miscela che porta a risultati in linea con quanto atteso è quella composta da PE e PET, nonostante la scarsa riproducibilità dei dati relativi al PE.

Al contrario, il polimero su cui sono state riscontrate maggiori interferenze è il PS; solo nella miscela col PE, infatti, mostra un valore di quantità all'interno dell'errore sperimentale, pur se con un RSD elevato. Negli altri casi invece i valori che si ottengono sono totalmente diversi rispetto alle quantità realmente analizzate.

C'è da considerare che il PS è l'unico dei polimeri che non viene addizionato nel tubo di pirolisi in forma solida, ma disciolto in solvente. Negli studi precedenti questa modalità di dosaggio è stata preferita in quanto garantiva più riproducibilità, ma non è da escludere che proprio questo aspetto possa portare a interferenze con gli altri polimeri. La diversa dimensione del materiale polimerico da pirolizzare potrebbe infatti essere un elemento di variabilità nella risposta pirolitica. A tal riguardo si è deciso negli studi futuri di fare valutazioni in merito e verificare se l'analisi debba essere calibrata, oltre che sulla quantità di polimero, anche sulla granulometria del campione.

5. APPLICAZIONE DEL METODO PER L'ANALISI AMBIENTALE

Terminata la messa a punto di un metodo di analisi tramite pirolisi abbinata alla GC-MS che ci permette di identificare alcune specie polimeriche e stimare l'ordine di grandezza della loro concentrazione, si è provato ad applicare la metodologia a campioni reali al fine di verificare la potenzialità del metodo nella determinazione delle microplastiche. Come matrice ambientale è stata scelta la sabbia, considerata un *sink* a medio termine per l'accumulo di microplastiche, in particolare in una zona, quella di Rimini, soggetta ad un'intensa presenza turistica nei mesi estivi.

I prelievi sono stati eseguiti, secondo la metodologia descritta precedentemente, in un'area adibita a spiaggia libera, dove cioè non viene eseguita un'attività giornaliera di pulizia. Nell'immagine seguente (Figura 34) è riportata la mappa della zona analizzata, con i transetti lungo cui sono stati prelevati i campioni di sabbia.

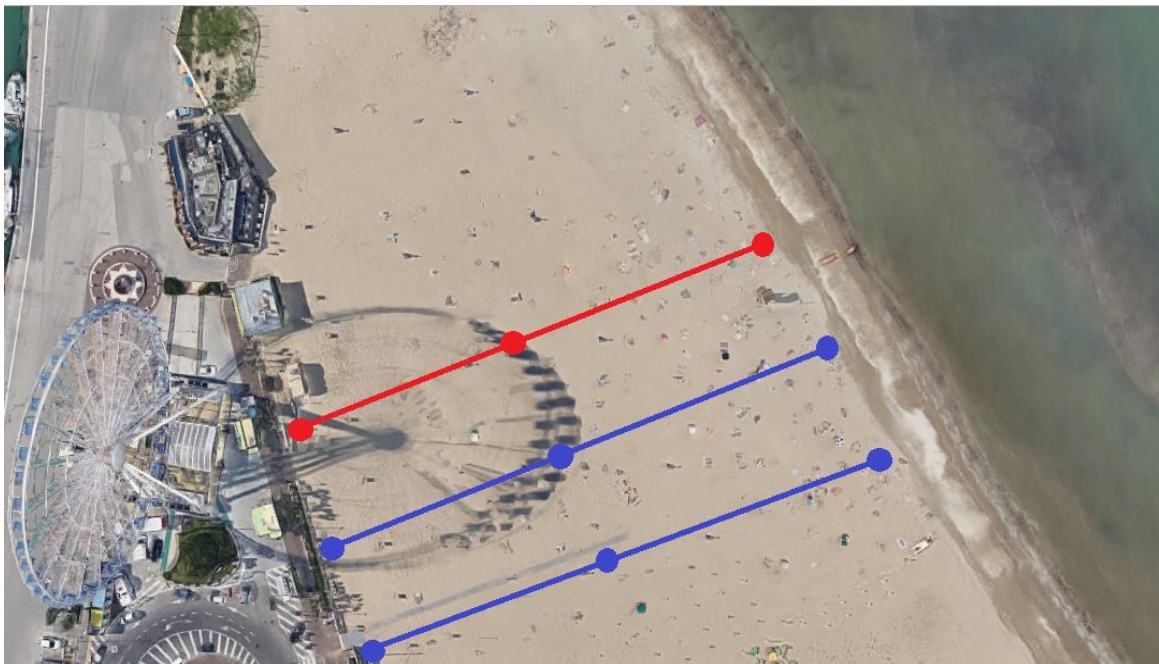


Figura 34: zona del litorale di Rimini su cui sono stati effettuati i campionamenti; in rosso è evidenziato il transetto relativo al campionamento di ottobre 2018, in blu quelli di novembre 2018. I pallini indicano i tre punti della spiaggia in cui si è campionato.

Come si nota dall'immagine, a ottobre è stato effettuato un prelievo lungo un solo transetto (linea rossa), mentre a novembre lungo due transetti (linee blu).

Come descritto nella metodologia riportata, da ogni frazione di sabbia prelevata sono stati pesati 100 g, su cui è stata eseguita la separazione densimetrica delle

microplastiche utilizzando una soluzione saturata di NaCl; le plastiche, separate dalla soluzione salina tramite filtrazione, sono state quindi sottoposte a pirolisi analitica tramite il metodo online, che è risultato più sensibile. Essendo la metodologia sviluppata per polimeri di bassa densità, in questa parte dello studio ci si è concentrati su PS e PE, tralasciando il PET, la cui densità richiederebbe l'uso di altri sali per la separazione densimetrica.

5.1 Risultati delle analisi del campionamento di ottobre

In Figura 35 vengono riportati i cromatogrammi relativi alle analisi dei tre punti prelevati lungo il transetto di ottobre.

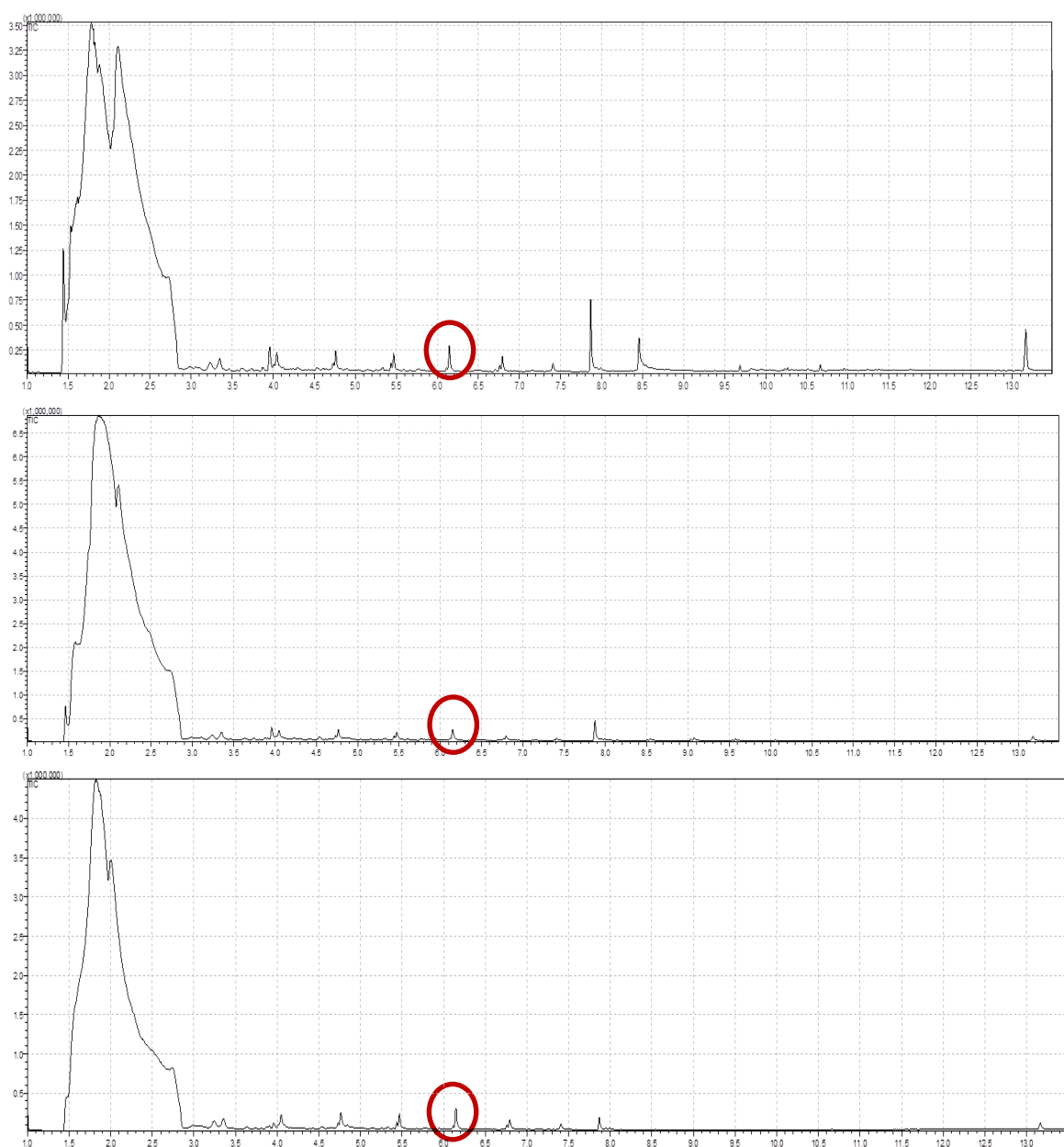


Figura 35: cromatogrammi delle microplastiche nella sabbia. Campionamento di ottobre.

Osservando i cromatogrammi si può notare il picco relativo all'1-tridecene ad un tempo di ritenzione di 6,150 minuti; perciò è stata identificata la presenza di polietilene in tutte e tre le frazioni di sabbia analizzate.

Per quanto riguarda il polistirene, invece, non si nota alcun picco relativo al suo prodotto target di pirolisi in nessuno dei tre cromatogrammi. Sono tuttavia presenti i picchi relativi sia allo stirene monomero ($t_{ritenzione}=3,230$ min) che al trimero ($t_{ritenzione}=13,190$ min). Sebbene il primo dei due non possa essere considerato un marker attendibile per verificare la presenza del polimero nei campioni ambientali, lo stesso discorso non vale per il trimero: è infatti un composto più raro da trovare come prodotto di pirolisi di composti naturali presenti comunemente in ambiente, ed è più associabile alla presenza di frammenti di PS. Inoltre, un'ulteriore particolarità è che solitamente il picco del trimero è quello con intensità minore, mentre in questo caso non solo è ben visibile, ma nella prima frazione ha un'intensità maggiore dello stirene monomero. Il motivo di questo particolare comportamento relativo al PS non risulta ancora del tutto chiaro, e dovrà essere oggetto di studi successivi.

Alla luce di quanto emerso dai cromatogrammi, è stato quindi possibile eseguire un'analisi di tipo quantitativo solamente riguardo al PE. Infatti, anche se i picchi dello stirene trimero sono visibili, l'andamento discontinuo, dovuto al fatto che il PS subisce delle interferenze quando si trova in miscele non li rende adatti per una quantificazione del contenuto di PS nelle sabbie. I risultati relativi all'1-tridecene sono riportati in Tabella 5.

Tabella 5: aree dei picchi dell'1-tridecene e quantità di PE corrispondenti relative al campionamento di ottobre

FRAZIONE	AREA 1-TRIDECENE	QUANTITA' PE ($\mu\text{g}/\text{hg}$ sabbia)
1	$4,8 \cdot 10^5$	59
2	$6,8 \cdot 10^5$	90
3	$7,3 \cdot 10^5$	96

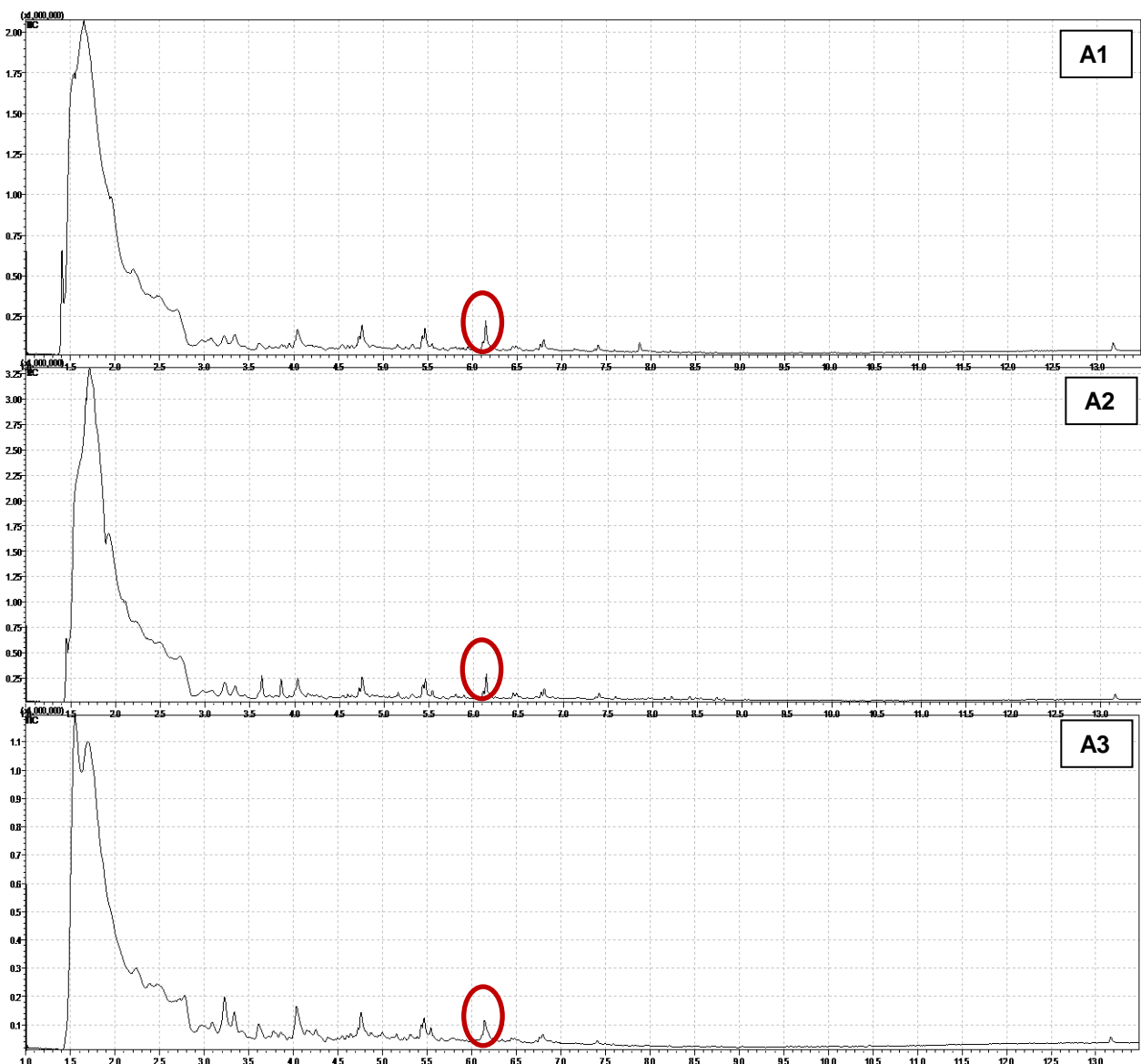
Dai risultati ottenuti si può notare che qualitativamente la concentrazione di polietilene nelle sabbie è minore nell'area più vicina alla battigia. Le concentrazioni riscontrate rientrano all'interno della retta di calibrazione, e risultano essere in linea con quelle riportate in alcuni studi presenti in letteratura. Ad esempio, Tiwari et al. [109] riportano quantità di microplastiche da 105 a 350 $\mu\text{g}/\text{hg}$, con una percentuale di PE di circa il 40%.

5.2 Risultati delle analisi dei campionamenti di novembre

Il campionamento effettuato a novembre ha riguardato due diversi transetti, rinominati Transetto A e Transetto B, posti circa a venti metri di distanza l'uno dall'altro. Nel periodo occorso tra questo campionamento ed il precedente si sono verificati diversi episodi di maltempo, tra cui uno molto intenso, caratterizzato anche da una mareggiata, il 29 ottobre 2018. Questo ha permesso di valutare l'eventuale variazione nella distribuzione delle microplastiche anche a seguito di fenomeni di weathering.

❖ Risultati Transetto A

Di seguito sono riportati i cromatogrammi delle tre frazioni analizzate, con evidenziato il picco dell'1-tridecene.



Anche in questo caso è stato riscontrato il comportamento osservato durante le analisi di ottobre: si possono osservare i tripli picchi indicativi della presenza del polietilene, tra cui quello dell'1-tridecene al tempo di ritenzione di 6,150 minuti, mentre riguardo al polistirene si notano i picchi relativi allo stirene monomero e al trimero, ma non quello del dimero; perciò l'unico polimero su cui risulta possibile effettuare una quantificazione è il PE.

In Tabella 6 sono riportati i valori delle aree del picco relativo all'1-tridecene e le concentrazioni di polimero corrispondenti.

Tabella 6: aree dei picchi e quantità di PE corrispondenti – transetto A

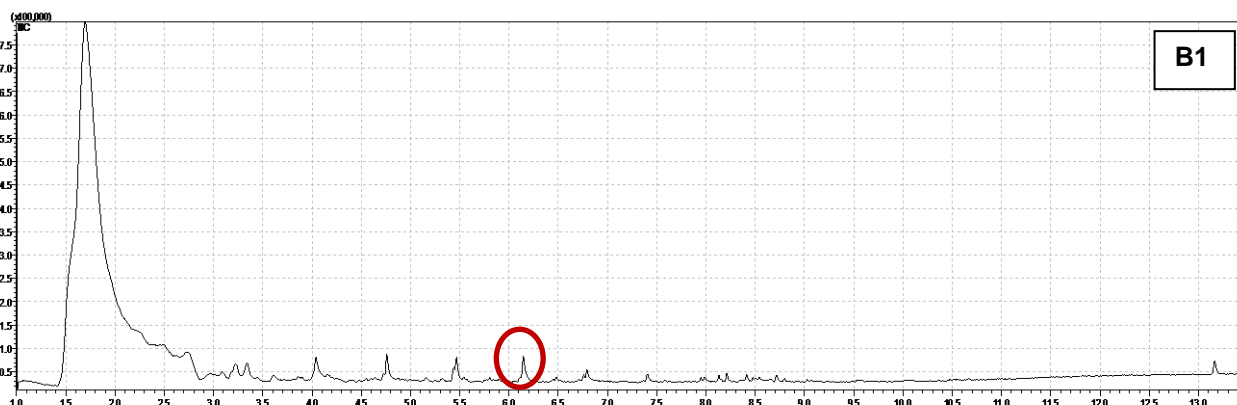
FRAZIONE	AREA 1-TRIDECENE	QUANTITA' PE ($\mu\text{g}/100\text{g}$ sabbia)
1	$5,1 \cdot 10^5$	64
2	$6,0 \cdot 10^5$	77
3	$3,6 \cdot 10^5$	42

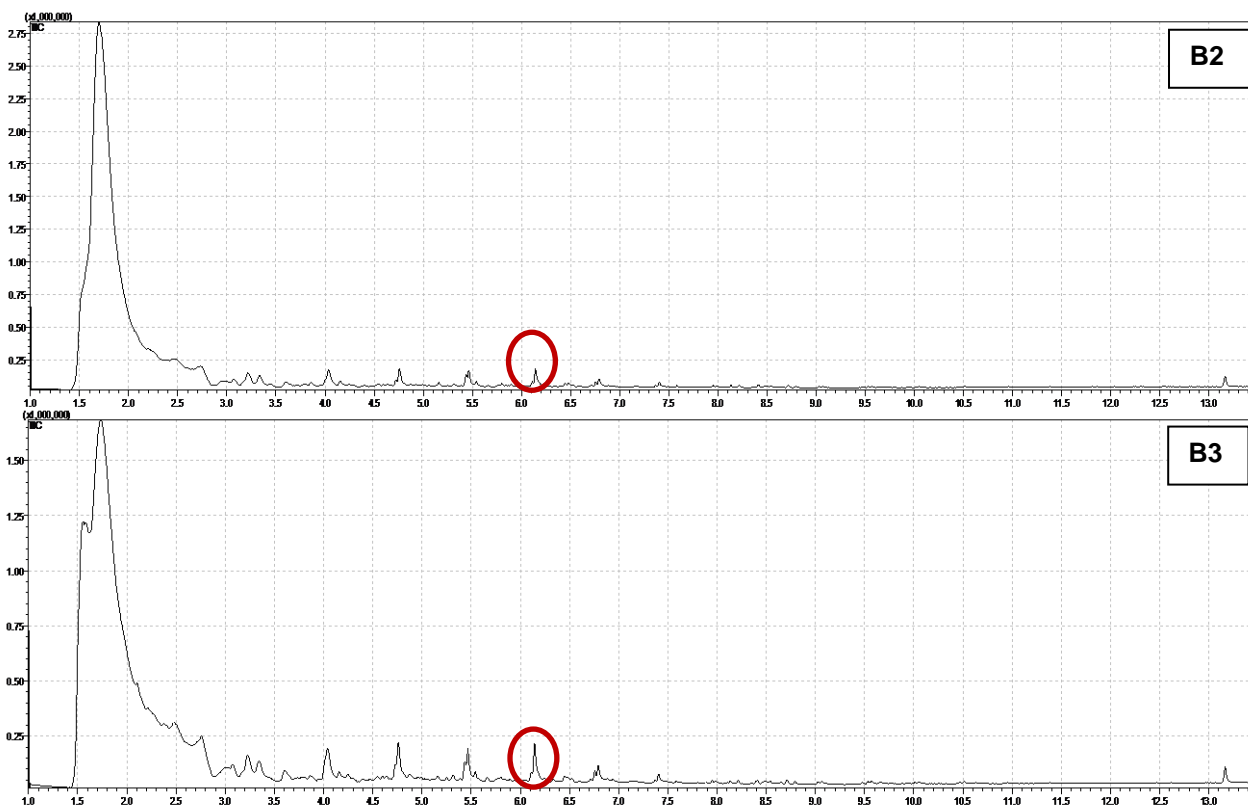
Come si nota dalla tabella, in questo caso l'andamento non è lo stesso rispetto al campionamento di ottobre. Infatti si è riscontrata una concentrazione maggiore di polimero nel campione prelevato a metà della spiaggia, mentre quello più lontano dal mare presenta la concentrazione minore.

I valori ottenuti rientrano comunque tutti all'interno della retta di calibrazione, e, a parte la terza frazione, risultano simili a quelli riscontrati nelle analisi precedenti.

❖ Risultati Transetto B

Vengono riportati di seguito i cromatogrammi relativi alle tre frazioni analizzate lungo il secondo transetto.





Il comportamento dei tre cromatogrammi non si discosta dagli andamenti riscontrati durante le precedenti analisi: l'unico polimero riscontrabile con certezza è il polietilene, mentre si continua a non osservare alcun picco relativo al dimero dello stirene, nonostante la presenza del monomero e del trimero. I risultati della quantificazione del PE, effettuata sulla base del picco dell'1-tridecene, sono riportati in Tabella 7.

Tabella 7: aree dei picchi e quantità di PE corrispondenti – transetto B

FRAZIONE	AREA 1-TRIDECENE	QUANTITA' PE ($\mu\text{g}/100\text{g}$ sabbia)
1	$2,2 \cdot 10^5$	21
2	$3,8 \cdot 10^5$	45
3	$5,0 \cdot 10^5$	63

I risultati delle analisi mostrano un andamento in linea con quanto riscontrato ad ottobre, ovvero un aumento della concentrazione di polimero man mano che ci si allontana dal mare. Anche in questo caso, le concentrazioni calcolate rientrano nella retta di calibrazione, anche se risultano minori rispetto alle prove precedenti.

6. CONCLUSIONI

Il presente elaborato di tesi ha costituito un primo approccio per lo sviluppo di una metodica per la determinazione delle microplastiche in campioni ambientali tramite pirolisi analitica; un metodo quali-quantitativo per l'analisi di routine di questi composti è infatti indispensabile, date le caratteristiche delle microplastiche e l'attenzione sempre crescente che stanno riscontrando a livello globale. Le metodiche seguite hanno permesso di combinare i vantaggi della pirolisi analitica, sia offline che online, con i vantaggi delle analisi in gascromatografia-spettrometria di massa (GC-MS), permettendo sia di analizzare masse molto piccole di campione che d'identificare i diversi polimeri presi in esame attraverso l'analisi dei loro principali prodotti di degradazione termica.

Dalle analisi preliminari è stato possibile osservare una convergenza tra i risultati delle pirolisi analitiche e i dati riportati in letteratura. Attraverso lo studio delle rette di calibrazione si è invece osservato un andamento lineare nella risposta delle aree dei picchi dei prodotti target in funzione della quantità di polimero analizzato; i coefficienti di correlazione infatti hanno mostrato valori soddisfacenti in relazione alla tecnica utilizzata (sempre maggiori di 0,9), pur con qualche leggera deviazione dalla linearità in corrispondenza del limite di quantificazione, in particolare per quanto riguarda il PET.

L'analisi delle miscele polimeriche, binarie e ternarie, ha invece evidenziato maggiori problematiche: la metodologia offline ha subito mostrato divergenze tra le quantità reali di polimeri analizzate e quelle calcolate dalle aree dei picchi; per tale motivo si è passati direttamente alla metodologia online, che grazie alla maggior sensibilità associata all'iniezione diretta dei prodotti di pirolisi in GC prevede l'uso di masse minori di polimeri ed una maggiore velocità di riscaldamento. I risultati ottenuti con la seconda metodologia si sono rivelati complessivamente migliori anche se non pienamente soddisfacenti: la riproducibilità dei risultati è in genere scarsa, come testimoniato da valori di RSD anche molto elevati. Inoltre, in particolare per il PS sono stati ottenuti risultati superiori all'errore sperimentale. Questo comportamento, osservato in entrambi gli approcci metodologici, sembra indicare che il polistirene subisce l'interferenza da parte di altri polimeri quando si trova in miscela.

L'analisi delle microplastiche nei campioni di sabbia, infine, ha consentito la determinazione quantitativa del solo PE: se infatti il PET è stato volutamente tralasciato a causa del metodo seguito (la soluzione salina non aveva una densità tale da portare in sospensione il polimero), dall'osservazione dei cromatogrammi non è stata riscontrata in alcun caso la presenza del picco relativo al 2,4-difenil-1-butene, nonostante fossero presenti quelli del monomero (che però non si può considerare un marker del PS) e del trimero (il cui andamento discontinuo, osservato già in precedenza, non lo rende un prodotto target affidabile). Perciò non è stata possibile una determinazione del PS, nonostante sia probabile la sua presenza. Il motivo di questo particolare comportamento non è stato ancora chiarito, e dovrà essere oggetto di studi successivi.

Per quanto riguarda la quantificazione del polietilene, dalle analisi effettuate sui tre transetti, sono state riscontrate concentrazioni molto simili (dai 21 ai 96 $\mu\text{g}/100\text{ g}$ di sabbia), e un andamento che, in due casi su tre, si è rivelato analogo, con una minore concentrazione nei pressi della battigia. Tali valori sono in linea con quanto riportato da Tiwari et al. Tuttavia ragionamenti più ampi riguardo alle microplastiche nella spiaggia analizzata necessiteranno di ulteriori campionamenti.

Questo elaborato ha quindi dimostrato le potenzialità della pirolisi analitica per la determinazione quantitativa o semi-quantitativa delle microplastiche; tuttavia, vi sono diversi aspetti su cui si sarà necessario svolgere altri studi: in primo luogo ci sarà bisogno di ampliare le plastiche sia in termini di tipologia di polimero che di diversi formulati (additivi e filler) della stessa famiglia. Inoltre è da valutare meglio in che modo la granulometria incide sulla risposta pirolitica e sull'interazione tra polimeri.

7. BIBLIOGRAFIA

- [1] *Plastics: a story of more than 100 years of innovation*, da www.plasticseurope.org
- [2] *A History of Plastics*, da www.bpf.co.uk
- [3] *Plastics – the Facts 2017. An Analysis of European Plastics Production, Demand and Waste Data*, PlasticsEurope, 2018
- [4] *Marine Plastic Debris and Microplastics: a new UNEP report on plastic pollution in our oceans*, UNEP, 2016
- [5] Harper C.A., *Handbook of plastics, elastomers & composites*, 4th ed., McGraw-Hill
- [6] Bui, T.; Giovanoulisa, G.; Cousins, A.; Magnér, J.; Cousins, I.; de Wit, C., *Human exposure, hazard and risk of alternative plasticizers to phtalate esters*, Science of the Total Environment, 2015
- [7] Carpenter, E.J.; Smith, K.L., *Plastics on the Sargasso Sea surface*, Science, 1972
- [8] *The New Plastics Economy: Rethinking the Future of Plastics & Catalysing Action*, Ellen MacArthur Foundation, 2017
- [9] Eriksen, M.; Lebreton, L.C.M.; Carson, H.S.; Thiel, M.; Moore, C.J.; Borerro, J.C.; Galgani, F.; Ryan, P.G.; Reisser, J., *Plastic Pollution in the World's Oceans: More than 5 Trillion Plastic Pieces Weighing over 250,000 Tons Afloat at Sea*, PlosOne, 2014
- [10] Galgani F.; Van Cauwenberghe, L.; Janssen, C. R.; Devriese, J.; Robbens, J., *Microplastics in sediments: a review of techniques, occurrence and effects*, Marine Environmental Research, 2015
- [11] Legge 27 dicembre 2017, n. 205, G.U. n.302 del 29-12-2017
- [12] Monteiro, R.C.P.; Ivar do Sul, J.A.; Costa, M.F., *Plastic pollution in islands of the Atlantic Ocean*, Environmental Pollution, 2018
- [13] *Microplastics and PFCs in the Antarctic*, Greenpeace, 2018

- [14] Bergmann, M.; Gutow, L.; Klages, M., *Marine Anthropogenic Litter*, Springer Open, 2015
- [15] <https://www.theguardian.com/environment/gallery/2008/dec/05/water-pollution-citarum-river>
- [16] Mato, Y.; Isobe, T.; Takada, H.; Kanehiro, H.; Ohtake, C.; Kaminuma, T., *Plastic resin pellets as a transport medium for toxic chemicals in the marine environment*, Environmental Science & Technology, 2001
- [17] *Marine litter assessment in the Mediterranean*, UNEP, 2015
- [18] Gregory, M.R.; Andrady, A.L., *Plastics in the marine environment*, John Wiley and Sons, 2003
- [19] Andrady, A., *Plastics and Environmental Sustainability*, Wiley, 2015
- [20] Arthur, C.; Baker, J.; Bamford, H., *Proceedings of the International Research Workshop on the Occurrence, Effects and Fate of Micro-plastics Marine Debris*, NOAA Technical Memorandum, 2009
- [21] Hong, S.H.; Shim W.J.; Hong L., *Methods of analysing chemicals associated to microplastics: a review*, Analytical Methods, 2017
- [22] <https://tg24.sky.it/ambiente/2018/01/22/cosmetici-microplastiche.html>
- [23] Boucher, J.; Friot D., *Primary Microplastics in the Oceans: A Global Evaluation of Sources*, IUCN, 2017
- [24] He, D.; Luo, Y.; Lu, S.; Liu, M.; Song, Y.; Lei, L., *Microplastics in soils: Analytical methods, pollution characteristics and ecological risks*, Trends in Analytical Chemistry, 2018
- [25] Lusher, A.L.; Hollman, P.C.H.; Mendoza-Hill, J.J., *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, 2017
- [26] *Marine plastic debris and microplastics – Global lessons and research to inspire action and guide policy change*, UNEP, 2016

- [27] Andray A.L., *Microplastics in the marine environment*, Marine Pollution Bulletin, 2011
- [28] Shaw, D.G.; Day, R.H., *Colour and form-dependant loss of plastic micro-debris from the North Pacific Ocean*, Marine Pollution Bulletin, 1994
- [29] Muthukumar, T.; Aravinthan, A.; Lakshmi, K.; Venkatesan, R.; Vedaprakash, L.; Doble, M., *Fouling and stability of polymers and composites in marine environment*, International Biodeterioration & Biodegradation, 2011
- [30] Van Sebille, E.; England, M.H.; Froyland, G., *Origin, dynamics and evolution of ocean garbage patches from observed surface drifters*, Environmental Research Letters, 2012
- [31] Moore, C.J.; Moore, S.L.; Leecaster, M.K.; Weisberg, S.B., *A comparison of plastic and plankton in the north pacific central gyre*, Marine Pollution Bulletin, 2001
- [32] <http://www.themalaymailonline.com/features/article/trash-islands-off-centralamerica-indicate-ocean-pollution-problem#sIBbjpfUxKXfEEkh.97>
- [33] Maximenko, N.; Hafner, J.; Niiler, P., *Pathways of marine debris from trajectories of Lagrangian drifters*, Marine Pollution Bulletin, 2012
- [34] <https://it.pinterest.com/pin/11962755239497394/?lp=true>
- [35] https://www.researchgate.net/figure/Upper-layer-circulation-and-main-features-in-the-Mediterranean-Sea-adapted-from-Millot_fig1_29620495
- [36] Zobkov, M.B.; Esiukova, E.E; Zyubin, A.Y.; Samusev, I.G., *Microplastic content variation in water column: The observations employing a novel sampling tool in stratified Baltic Sea*, Marine Pollution Bulletin, 2019
- [37] Courtene-Jones, W.; Quinn, B.; Gary, S.F.; Mogg, A.O.M.; Narayanaswamy, B.E., *Microplastic pollution identified in deep-sea water and ingested by benthic invertebrates in the Rockall Trough, North Atlantic Ocean*, Environmental Pollution, 2017
- [38] Lusher, A.L.; O'Donnell, C.; Officer, R.; O'Connor, I., *Microplastic interactions with North Atlantic mesopelagic fish*, ICES Journal of Marine Science, 2016

- [39] European Marine Strategy Framework Directive, 2008/56/EC
- [40] Koelmans, A.A.; Besseling, E.; Foekema, E.; Kooi, M.; Mintenig, S.; Ossendorp, B.C.; Redondo-Hasselerharm, P.E.; Verschoor, A.; van Wezel, A.P.; Scheffer, M., *Risks of plastic debris: unravelling fact, opinion, perception and belief*, Environmental Science & Technology, 2017
- [41] Zarfl, C.; Matthies, M., *Are marine plastic particles transport vectors for organic pollutants to the Arctic?*, Marine Pollution Bulletin, 2010
- [42] Mintenig, S.M.; Löder, M.G.J.; Primpke S.; Gerdt G., *Low numbers of microplastics detected in drinking water from groundwater sources*, Science of the Total Environment, 2018
- [43] Renzi, M.; Blašković, A., *Litter and microplastics features in table salts from marine origin: Italian versus Croatian brands*, Marine Pollution Bulletin, 2018
- [44] Rosse, P.; Loizeau, J.L., *Use of single particle counters for the determination of the number and size distribution of colloids in natural surface waters*, Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects, 2003
- [45] European Commission Regulation No. 10/2011 on plastic materials and articles intended to come into contact with food, 2011
- [46] Talsness, C.E.; Andrade, A.J.M.; Kuriyama S.N.; Taylor, J.A.; vom Saal F.S., *Components of plastic: experimental studies in animals and relevance for human health*, Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences, 2009
- [47] Munn, S.; Goumenou, M., *Thresholds for endocrine disrupters and related uncertainties. Report of the Endocrine Disrupters Expert Advisory Group*, European Commission, 2013
- [48] Rochman, C.M.; Hoh, E.; Hentschel, B.T.; Kaye, S., *Long-term field measurement of sorption of organic contaminants to five types of plastic pellets: Implications for plastic marine debris*, Environmental Science and Technology, 2013
- [49] Holmes, L.A.; Turner, A.; Thompson, R.C., *Interactions between trace metals and plastic production pellets under estuarine conditions*, Marine Chemistry, 2014

- [50] Ogata, Y.; Takada, H.; Mizukawa, K.; Hirai, H.; Iwasa, S.; Endo, S., *International pellet watch: Global monitoring of persistent organic pollutants (POPs) in coastal waters. 1. Initial phase data on PCBs, DDTs, and HCHs*, Marine Pollution Bulletin, 2009
- [51] Teuten, E.L.; Rowland, S.J.; Galloway, T.S.; Thompson, R.C., *Potential for plastics to transport hydrophobic contaminants*, Environmental Science and Technology, 2007
- [52] Holmes, L.A.; Turner, A.; Thompson, R.C., *Adsorption of trace metals to plastic resin pellets in the marine environment*, Environmental Pollution, 2012
- [53] *Sources, fate and effects of microplastics in the marine environment: a global assessment*, GESAMP, 2015
- [54] Vandenberg, L.N.; Hauser, R.; Marcus, M.; Olea, N.; Welshons, W.V., *Human exposure to bisphenol A (BPA)*, Reproductive Toxicology, 2007
- [55] Latini, G.; De Felice, C.; Verrotti, A., *Plasticizers, infant nutrition and reproductive health*, Reproductive Toxicology, 2004
- [56] Endo, S.; Takizawa, R.; Okuda, K.; Takada, H.; Chiba, K.; Kanehiro, H.; Ogi, H.; Yamashita, R.; Date, T., *Concentration of polychlorinated biphenyls (PCBs) in beached resin pellets: variability among individual particles and regional differences*, Marine Pollution Bulletin, 2005
- [57] Galgani, F., *Marine litter, future prospects for research*, Frontiers in Marine Science, 2015
- [58] Ashton, K.; Holmes, L.; Turner, A., *Association of metals with plastic production pellets in the marine environment*, Marine Pollution Bulletin, 2010
- [59] Barnes, D. K. A.; Galgani, F.; Thompson, R. C.; Barlaz, M., *Accumulation and fragmentation of plastic debris in global environments*, Philosophical Transactions of the Royal Society of London B: Biological Sciences, 2009
- [60] Taylor, M. L.; Gwinnett, C.; Robinson, L. F.; Woodall, L. C., *Plastic microfibre ingestion by deep-sea organisms*, Scientific reports, 2016

- [61] Van Cauwenberghe, L.; Janssen, C. R., *Microplastics in bivalves cultured for human consumption*, Environmental Pollution, 2014
- [62] Avio, C.G.; Gorbi, S.; Milan, M.; Benedetti, M.; Fattorini, D.; D'Errico, G.; Pauletto, M.; Bargelloni, L.; Regoli, F., *Pollutants bioavailability and toxicological risk from microplastics to marine mussels*, Environmental Pollution, 2015
- [63] Rios, L.M.; Moore, C., *Persistent organic pollutants carried by synthetic polymers in the ocean environment*, Marine Pollution Bulletin, 2007
- [64] Callaghan, A.; Al-Jaibachi, R.; Cuthbert, R.N., *Examining effects of ontogenic microplastic transference on Culex mosquito mortality and adult weight*, Science of the Total Environment, 2018
- [65] Royer, S.J.; Ferrón, S.; Wilson, S.T.; Karl, D.M., *Production of methane and ethylene from plastic in the environment*, Plos One, 2018
- [66] *Statement on the presence of microplastics and nanoplastics in food, with particular focus on seafood*, EFSA Panel on Contaminants in the Food Chain, 2016
- [67] Gallo, F.; Fossi, C.; Weber, R.; Santillo, D.; Sousa, J.; Ingram, I.; Nadal, A.; Romano, D., *Marine litter plastics and microplastics and their toxic chemicals components: the need for urgent preventive measures*, Environmental Sciences Europe, 2018
- [68] Klein, S.; Dimzon, I. K.; Eubeler, J.; Knepper, T. P., *Analysis, occurrence, and degradation of microplastics in the aqueous environment*, in Freshwater Microplastics, Springer, 2018
- [69] Ivleva N. P.; Wiesheu, A. C.; Niessner R., *Microplastic in aquatic ecosystems*, Angewandte Chemie International Edition, 2017
- [70] Woodall, L.C.; Sanchez-Vidal, A.; Canals, M.; Paterson, G.L.; Coppock, R.; Sleight, V.; Calafat, A.; Rogers, A.D.; Nayaramaswamy, B.E.; Thompson, R.C., *The deep sea in a major sink for microplastic debris*, Royal Society Open Science, 2014
- [71] Hidalgo-Ruz, V.; Gutow, L.; Thompson, R. C.; Thiel, M., *Microplastics in the marine environment: A review of the methods used for identification and quantification*, Environmental Science and Technology, 2012

- [72] Löder, M.G.J.; Gerdt, G., *Methodology Used for the Detection and Identification of Microplastics - A Critical Appraisal*, in *Marine Anthropogenic Litter*, Springer, 2015
- [73] Claessens, M.; De Meester, S.; Van Landuyt, L.; De Clerck, K.; Janssen, C. R., *Occurrence and distribution of microplastics in marine sediments along the Belgian coast*, *Marine Pollution Bulletin*, 2011
- [74] Hanke, G.; Galgani, F.; Werner, S.; Oosterbaan, L.; Nilsson, P.; Fleet, D.; et al., *MSFD GES technical subgroup on marine litter. Guidance on monitoring of marine litter in European Seas*, Luxembourg: Joint Research Centre–Institute for Environment and Sustainability, Publications Office of the European Union, 2013
- [75] Van Cauwenberghe, L.; Vanreusel, A.; Mees, J.; Janssen, C. R., *Microplastic pollution in deep-sea sediments*, *Environmental Pollution*, 2013
- [76] Nuelle, M. T.; Dekiff, J. H.; Remy, D.; Fries, E., *A new analytical approach for monitoring microplastics in marine sediments*, *Environmental Pollution*, 2014
- [77] Liebezeit, G.; Dubaish, F., *Microplastics in beaches of the East Frisian Islands Spiekeroog and Kachelotplate*, *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 2012
- [78] Imhof, H. K.; Schmid, J.; Niessner, R.; Ivleva, N. P.; Laforsch, C., *A novel, highly efficient method for the separation and quantification of plastic particles in sediments of aquatic environments*, *Limnology and Oceanography-Methods*, 2012
- [79] *Marine Litter Vital Graphics*, UNEP and GRID-Arendal, 2016
- [80] Wagner, J.; Wang, Z.M.; Ghosal, S.; Rochman, C.; Gassel, M.; Wall, S., *Novel method for the extraction and identification of microplastics in ocean trawl and fish gut matrices*, *Analytical Methods*, 2017
- [81] Cole, M.; Webb, H.; Lindeque, P.K.; Fileman, E.S.; Halsband, C.; Galloway, T.S., *Isolation of microplastics in biota-rich seawater samples and marine organisms*, *Scientific Reports*, 2014

- [82] Vlachogianni, Th.; Anastasopoulou, A.; For Buoni, T.; Ronchi, F.; Zeri, Ch., *Marine Litter Assessment in the Adriatic and Ionian Seas*, IPA-Adriatic DeFishGear Project, MIO-ECSDE, HCMR and ISPRA, 2017
- [83] Silva, A.B.; Bastos, A.S.; Justino, C.I.L.; da Costa, J.P.; Duarte, A.C.; Rocha-Santos, T.A.P., *Microplastics in the environment: challenges in analytical chemistry – a review*, *Analytica Chimica Acta*, 2018
- [84] Shim, W.J.; Hong, S.H.; Eo, S.E., *Identification methods in microplastic analysis: a review*, *Analytical Methods*, 2017
- [85] Eriksen, M.; Mason, S.; Wilson, S.; Box, C.; Zellers, A.; Edwards, W.; Farley, H.; Amato, S., *Microplastic pollution in the surface waters of the Laurentian Great Lakes*, *Marine Pollution Bulletin*, 2013
- [86] Camacho, W.; Karlsson, S., *NIR, DSC, and FTIR as quantitative methods for compositional analysis of blends of polymers obtained from recycled mixed plastic waste*, *Polymer Engineering & Science*, 2001
- [87] Gago, J.; Galgani, F.; Maes, T.; Thompson, R.C., *Microplastics in Seawater: Recommendations from the Marine Strategy Framework Directive Implementation Process*, *Frontiers in Marine Science*, 2016
- [88] Mistri, M.; Infantini, V.; Scoponi, M.; Granata, T.; Moruzzi, L.; Massara, F.; Munari, C., *Small plastic debris in sediments from the Central Adriatic Sea: Types, occurrence and distribution*, *Marine Pollution Bulletin*, 2017
- [89] Cai, L.; Wang, J.; Peng, J.; Tan, Z.; Zhan, X.; Tan, Q., *Characteristic of microplastics in the atmospheric fallout from Dongguan city, China: preliminary research and first evidence*, *Environmental Science & Pollution*, 2017
- [90] Ribeiro-Claro, P.; Nolasco, M.M.; Araújo, C.; *Chapter 5 – Characterization of microplastics by Raman spectroscopy*, *Comprehensive Analytical Chemistry*, 2017
- [91] Karami, A.; Golieskardi, A.; Ho, Y.B.; Larat, V.; Salamantina, B., *Microplastics in eviscerated flesh and excised organs of dried fish*, *Scientific Reports*, 2017

- [92] Lenz, R.; Enders, K.; Stedmon, C.A.; Mackenzie, D.M.A.; Nielsen, T.G., *A critical assessment of visual identification of marine microplastics using Raman spectroscopy for analysis improvement*, Marine Pollution Bulletin, 2015
- [93] Qiu, Q.; Tan, Z.; Wang, J.; Peng, J.; Li, M.; Zhan, Z., *Extraction, enumeration and identifications methods for monitoring microplastics in the environment*, Estuarine, Coastal and Shelf Science, 2016
- [94] Fabbri, D., *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, 2001
- [95] Fries, E.; Dekiff, J.H.; Willmeyer, J.; Nuelle, M.T.; Ebert, M.; Remy, D., *Identification of polymer types and additives in marine microplastic particles using pyrolysis-GC/MS*, Environmental Science, 2013
- [96] Kusch, P., *Pyrolysis-gas chromatography/mass spectrometry of polymeric materials. In Advanced Gas Chromatography-Progress in Agricultural, Biomedical and Industrial Applications*, InTech, 2012
- [97] Rocha-Santos, T.; Duarte, A.C., *A critical overview of the analytical approaches to the occurrence, the fate and the behavior of microplastics in the environment*, Trends in Analytical Chemistry, 2015
- [98] Dehaut, A.; Cassone, A.L.; Frere, L.; Hermabessiere, L.; Himber, C.; Rinnert, E.; Riviere, G.; Lambert, C.; Soudant, P.; Huvet, A.; Duflos, G.; Paul-Pont, I., *Microplastics in seafood: benchmark protocol for their extraction and characterization*, Environmental Pollution, 2016
- [99] Majewsky, M.; Bitter, H.; Eiche, E.; Horn, H., *Determination of microplastic polyethylene (PE) and polypropylene (PP) in environmental samples using thermal analysis (TGA-DSC)*, Science of the Total Environment, 2016
- [100] Dümichen, E.; Bannick, C.G.; Barthel, A.K.; Senz, R.; Braun, U.; Brand, K.; Jekel, M., *Analysis of polyethylene microplastics in environmental samples, using a thermal decomposition method*, Water Research, 2015

- [101] Dümichen, E.; Eisentraut, P.; Bannick, C.G.; Barthel, A.K.; Senz, R.; Braun, U., *Fast identification of microplastics in complex environmental samples by a thermal degradation method*, Chemosphere, 2017
- [102] Majewsky, M.; Bitter, H.; Eiche, E.; Horn, H., *Determination of microplastic polyethylene (PE) and polypropylene (PP) in environmental samples using thermal analysis (TGA-DSC)*, Science of the Total Environment, 2016
- [103] Imhof, H.K.; Wiesheu, A.C.; Anger, P.M.; Niessner, R.; Ivleva, N.P.; Laforsch, C., *Variation in plastic abundance at different lake beach zones – a case study*, Science of the Total Environment, 2017
- [104] Tavares Moreira, F.; Prantoni, A.L.; Martini, B.; Alves de Abreu, M.; Stoiev, S.B.; Turra, A., *Small-scale temporal and spatial variability in the abundance of plastic pellets on sandy beaches: Methodological considerations for estimating the input of microplastics*, Marine Pollution Bulletin, 2015
- [105] Abidli, S.; Antunes, J.C.; Ferreira, J.L.; Lahbib, Y.; Sobral, P.; Trigui El Menif, N., *Microplastics in sediments from the littoral zone of the north Tunisian coast (Mediterranean Sea)*, Estuarine, Coastal and Shelf Science, 2018
- [106] Hengstmann, E.; Tamminga, M.; vom Bruch, C.; Fischer, E.K., *Microplastic in beach sediments of the Isle of Rügen (Baltic Sea) - Implementing a novel glass elutriation column*, Marine Pollution Bulletin, 2017
- [107] Becerra, V.; Odermatt, J., *Detection and quantification of traces of bisphenol A and bisphenol S in paper samples using analytical pyrolysis-GC/MS*, Analyst, 2012
- [108] Hermabessiere, L.; Himber, C.; Boricaud, B.; Kazour, M.; Amara, R. et al., *Optimization, performance, and application of a pyrolysis-GC/MS method for the identification of microplastics*, HAL, 2018
- [109] Tiwari, M.; Rathod, T.D.; Ajmal, P.Y.; Bhangare, R.C.; Sahu, S.K., *Distribution and characterization of microplastics in beach sand from three different Indian coastal environments*, Marine Pollution Bulletin, 2019