

UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI GENOVA

Scuola di Scienze Matematiche, Fisiche e Naturali



Dipartimento di Chimica e Chimica Industriale

Corso di Laurea Magistrale in Scienze Chimiche

Tesi di Laurea

**IDENTIFICAZIONE DI MICROPLASTICHE IN MATRICI DI INTERESSE
CLINICO E CARATTERIZZAZIONE DI MICROSFERE POLIMERICHE
STANDARD**

Relatori

Prof. Stefano Alberti

Dott.ssa Sara Massardo

Correlatori

Prof.ssa Cristina Artini

Prof.ssa Paola Rivaro

Candidata

Claudia Caboni

Anno Accademico 2025/2026

INDICE

ELENCO DELLE SIGLE	3
1 SCOPO DELLA TESI	4
2 INTRODUZIONE	6
2.1 Le materie plastiche	6
2.2 Lo smaltimento dei rifiuti plastici	9
2.3 Le microplastiche	11
2.3.1 <i>Interazione tra microplastiche e altri inquinanti ambientali</i>	12
2.3.2 <i>Distribuzione delle microplastiche negli ecosistemi</i>	14
2.3.3 <i>Identificazione di microplastiche nell'organismo umano</i>	16
2.4 L'analisi di microplastiche in campioni reali: metodi e ostacoli	19
2.4.1 <i>Campionamento</i>	20
2.4.2 <i>Pre-trattamento del campione</i>	21
2.4.3 <i>Separazione dalla matrice</i>	23
2.4.4 <i>Tecniche analitiche</i>	23
2.4.4.1 <i>Microscopia</i>	24
2.4.4.2 <i>Cromatografia e spettrometria</i>	24
2.4.4.3 <i>Spettroscopia vibrazionale</i>	25
2.5 L'analisi di microplastiche commerciali	25
2.5.1 <i>Valutazione dell'ecotossicità e della bio-distribuzione</i>	26
2.5.2 <i>Degradazione simulata</i>	27
2.5.3 <i>Analisi delle proprietà chimico-fisiche mediante tecnica DLS</i>	27
3 MATERIALI E METODI	29
3.1 Fluidi per la dialisi peritoneale	29
3.1.1 <i>Valutazione della membrana filtrante idonea per i fluidi da dialisi peritoneale</i>	30
3.1.2 <i>Preparazione dei campioni di fluidi di dialisi</i>	31
3.2 Exhaled Breath Condensate (EBC)	33
3.2.1 <i>Valutazione del supporto ottimale</i>	34
3.2.2 <i>Preparazione dei campioni di EBC</i>	34
3.3 Sospensioni di microplastiche standard	35
3.3.1 <i>Preparazione della soluzione acida e basica</i>	35

3.3.2	<i>Preparazione dei campioni di polietilene</i>	36
3.3.3	<i>Preparazione dei campioni di polistirene</i>	37
3.4	Tecniche di caratterizzazione	38
3.4.1	<i>Spettroscopia micro-Raman</i>	38
3.4.1.1	<i>SpeComp</i>	40
3.4.2	<i>Dynamic Light Scattering-Laser Doppler Electrophoresis</i>	42
3.4.3	<i>Microscopia elettronica a scansione (SEM)</i>	45
4	RISULTATI E DISCUSSIONE	47
4.1	Caratterizzazione dei campioni reali	47
4.1.1	<i>Selezione della membrana filtrante e del supporto</i>	47
4.1.2	<i>Analisi dei fluidi di dialisi</i>	52
4.1.3	<i>Analisi degli esalati condensati</i>	64
4.2	Caratterizzazione dei campioni standard	75
4.2.1	<i>Analisi del diametro idrodinamico e del potenziale Zeta</i>	75
4.2.2	<i>Analisi dimensionale con la microscopia elettronica</i>	94
5	CONCLUSIONI	97
6	BIBLIOGRAFIA	100

ELENCO DELLE SIGLE

ABS	Acrilonitrile butadiene stirene
CA	Acetato di cellulosa
CPE	Polietilene clorurato
DLS	Dynamic Light Scattering
EBC	Exhaled Breath Condensate
LDE	Laser Doppler Electrophoresis
EVA	Acetato di vinil-etilene
HQI	Hit Quality Index
IPA	Idrocarburi policiclici aromatici
MP	Microplastiche
MRC	Malattia renale cronica
NC	Nitrocellulosa
PA	Poliammide
PAN	Poliacrilonitrile
PC	Policarbonato
PE	Polietilene
PMMA	Polimetilmetacrilato
PES	Polieteresulfone
PET	Polietilene tereftalato
PEVA	Polietilene vinil acetato
POM	Poliossimetilene
PP	Polipropilene
PTFE	Politetrafluoroetilene
PU/PUR	Poliuretano
PVC	Polivinilcloruro
PVDF	Polivinildenfluoruro
PVOH	Alcol polivinilico
SEBS	Stirene-etilene-butilene-stirene
SEM	Scanning Electron Microscopy
TPE	Elastomero termoplastico

1 SCOPO DELLA TESI

Il presente progetto di tesi è stato svolto presso il Dipartimento di Chimica e Chimica Industriale (D.C.C.I.) dell'Università degli Studi di Genova, in particolare presso i laboratori di ricerca dell'Unità Operativa *Chimica Fisica dei Materiali e dei Processi*, sotto la supervisione del Prof. Stefano Alberti, della Dott.ssa Sara Massardo (Consiglio Nazionale delle Ricerche, Istituto di Chimica della Materia Condensata e di Tecnologie per l'Energia, CNR-ICMATE) e della Prof.ssa Cristina Artini. L'attività di ricerca è stata eseguita in collaborazione con il Dott. Edoardo La Porta, dell'Istituto G. Gaslini (Genova), la Dott.ssa Daniela Verzola, dell'Ospedale Policlinico S. Martino (Genova) e la Dott.ssa Anna Maria Riccio, dell'Ospedale Policlinico S. Martino (Genova).

Il presente lavoro di tesi nasce da una precedente collaborazione tra il gruppo di ricerca dei supervisor e quello del Dott. Edoardo La Porta e della Dott.ssa Daniela Verzola; grazie a tale collaborazione era stata rilevata per la prima volta la presenza di microplastiche e loro additivi in campioni di rene e urina umani [1]. La presenza di microplastiche nei tessuti renali, insieme all'aumento dell'incidenza della malattia renale cronica (MRC), evidenzia la necessità di valutare il potenziale coinvolgimento di questi inquinanti nell'insorgenza di questa condizione. Per tale motivo lo studio è stato esteso ai fluidi utilizzati per la dialisi peritoneale. Questa è una terapia di sostituzione renale basata sull'impiego di soluzioni sterili che, una volta introdotte mediante un catetere nella cavità peritoneale, utilizzano quest'ultima come superficie di scambio, consentendo la rimozione di sostanze di scarto dall'organismo [2].

Poiché le microplastiche sono state rinvenute nei reni e nelle urine, l'escrezione urinaria rappresenta una delle possibili vie di eliminazione. La valutazione di frammenti plastici in determinate tipologie di campioni dovrebbe poter essere correlata all'insorgenza di infiammazioni croniche. D'altra parte, è fondamentale valutare anche la possibile contaminazione dei liquidi utilizzati nelle terapie, essendo spesso stoccati in plastica. Il presente lavoro riguarda quindi uno studio preliminare volto a valutare la possibile contaminazione da microplastiche dei fluidi per dialisi in entrata. Tali soluzioni, essendo stoccate in sacche di plastica, possono infatti essere soggette al rilascio di microplastiche sia durante i processi di produzione, sia a causa della degradazione dei materiali di imballaggio, costituendo un'ulteriore potenziale via di esposizione diretta per il paziente. La caratterizzazione dei frammenti presenti all'interno dei fluidi in entrata è pertanto essenziale, sia per valutare l'effettiva esposizione diretta del paziente alle particelle, sia per poter determinare in seguito e con maggior accuratezza la reale quantità di microplastiche presenti negli effluenti e quindi rimosse dall'organismo del paziente durante il trattamento.

In parallelo a quest'indagine, è stato condotto un ulteriore studio preliminare su una differente tipologia di matrice di elevato interesse clinico. In collaborazione con la Dott.ssa Anna Maria Riccio, è stata valutata la presenza di microplastiche in campioni di condensato dell'aria espirata (EBC, *Exhaled Breath Condensate*). Tali campioni, provenienti da pazienti affetti da differenti patologie dell'apparato respiratorio, rappresentano un potenziale mezzo diagnostico, in quanto l'EBC permette di campionare in modo non invasivo il fluido che riveste le vie aeree. L'analisi di questa tipologia di campioni permette di indagare la possibile espulsione, tramite l'esalazione, di eventuali microplastiche inalate, fornendo un'indicazione sulla presenza di queste ultime all'interno del sistema respiratorio, per poter poi valutare, in un secondo momento, una potenziale correlazione tra la presenza di tali particelle e l'insorgenza di malattie respiratorie croniche.

La caratterizzazione chimico-fisica è stata eseguita mediante la tecnica di spettroscopia micro-Raman (μ -Raman), una tecnica ampiamente utilizzata per rilevare la presenza di microplastiche all'interno di matrici complesse. Lo studio ha incluso una fase preliminare di ottimizzazione delle condizioni operative per l'analisi spettroscopica, compatibili con le diverse tipologie di campioni esaminati.

Oltre alle caratterizzazioni dei campioni reali, una sezione del progetto di tesi si focalizza sull'analisi di sospensioni di microparticelle standard di polietilene (PE) e polistirene (PS) disperse in matrice acquosa. La caratterizzazione chimico-fisica è stata condotta mediante lo Zetasizer Nano ZS90, uno strumento che sfrutta due tecniche complementari che si basano sulla diffusione della luce: il *Dynamic Light Scattering* (DLS), per la misura del diametro idrodinamico, e la *Laser Doppler Electrophoresis* (LDE), per la determinazione del potenziale Zeta.

Tali parametri risultano fondamentali non solo per definire la stabilità colloidale della sospensione, ma anche per comprendere i meccanismi di interazione tra le microplastiche e le sostanze chimiche presenti nell'ambiente. Nello specifico, sono state indagate le variazioni di diametro idrodinamico e di potenziale Zeta in funzione di alcuni parametri, quali la concentrazione delle particelle, la temperatura e il pH del mezzo di dispersione. Un obiettivo centrale della ricerca è l'individuazione dei limiti operativi al progressivo aumentare della complessità della matrice, stabilendo i criteri necessari per lo studio e l'interpretazione di dati ottenuti dai campioni dispersi in essa.

2 INTRODUZIONE

2.1 Le materie plastiche

Con il termine plastica ci si riferisce a un gruppo di polimeri di origine sintetica. Essi vengono prodotti utilizzando come reagenti composti organici, i quali possono essere di origine fossile (es. gas, petrolio), rinnovabile (es. amido, oli vegetali) o minerale (sali). Questi composti, detti monomeri, rappresentano le unità di ripetizione del polimero finale: mediante reazioni chimiche di polimerizzazione, reagiscono tra loro formando legami covalenti, consentendo la produzione di macromolecole caratterizzate da una successione di tali unità di ripetizione. Alcuni dei monomeri più utilizzati per la produzione di plastiche sono etilene e propilene [3].

Le reazioni di polimerizzazione possono essere di addizione o di condensazione:

- Polimerizzazione per addizione: coinvolge monomeri di partenza insaturi. La reazione avviene al doppio legame, convertendo il legame π del monomero in un legame σ che unisce i monomeri nella catena polimerica.
- Polimerizzazione per condensazione: coinvolge monomeri bifunzionali o polifunzionali. La reazione tra i gruppi funzionali dei monomeri porta a un nuovo gruppo funzionale nel polimero finale che conferisce proprietà chimiche differenti rispetto ai materiali di partenza.

A seconda del tipo di reazione, si ottengono due grandi classi di polimeri, detti poliolefine, se ottenuti attraverso reazioni di addizione, e policondensati, se ottenuti mediante reazioni di condensazione. A loro volta i policondensati si suddividono in ulteriori sottocategorie caratterizzate dal gruppo funzionale formatosi in seguito alla polimerizzazione: poliesteri (es. polietilene tereftalato (PET)), poliammidi (es. poliammide 6.6 (PA66)), poliuretani. I polimeri rappresentano la componente principale (matrice) della plastica, alla matrice vengono aggiunti additivi che consentono di ottimizzare le prestazioni del prodotto finale, migliorandone le proprietà intrinseche o impartendo nuove proprietà. Gli additivi utilizzati possono essere riempitivi, coloranti o pigmenti, agenti schiumogeni, plastificanti, ritardanti di fiamma, antiossidanti, stabilizzatori termici, lubrificanti, stabilizzatori UV, agenti antistatici. Le molteplici proprietà di questi materiali li rendono adatti per svariate applicazioni e la loro versatilità li rende indispensabili nella vita quotidiana: attualmente trovano impiego in ambito medico e industriale, vengono utilizzati nell'abbigliamento, nei giocattoli, nei cosmetici e per la conservazione di alimenti [4].

La storia dei materiali plastici (Figura 1) inizia nella seconda metà del 1800. Alexander Parkes, in seguito ai suoi studi sulla cellulosa, sintetizzò un materiale capace di essere

modellato utilizzando una fonte di calore e di mantenere la sua forma dopo il raffreddamento. Questa prima materia plastica venne presentata nel 1862 all'Esposizione Mondiale di Londra e successivamente messa in commercio con il nome di "Parkesina": il suo utilizzo era destinato alla produzione di manici e scatole, ma trovò impiego anche nell'industria tessile per realizzare parti di indumenti, quali polsini e colletti. Qualche anno dopo John Wesley Hyatt a partire dalla nitrocellulosa, ricavò, mediante una sintesi che prevedeva l'utilizzo di calore e pressione e l'aggiunta di canfora e alcol, la Celluloide. Questa, oltre a divenire un valido sostituto dell'avorio, trovò impiego anche presso gli studi dentistici nella realizzazione di impronte dentali. Nel 1884 il chimico Hilaire de Chardonnet brevettò il Rayon, il quale rappresentò per l'industria tessile un'alternativa più economica a prodotti naturali come la seta. Nel XX secolo lo sviluppo della chimica porterà a importanti innovazioni, nel 1907 Leo Baekeland ottenne in laboratorio la Bakelite, la prima resina termoindurente, utilizzata per ottenere numerosi manufatti ampiamente utilizzati nella vita quotidiana. Nel 1912 Fritz Klatte scoprì il processo di produzione del polivinilcloruro (PVC), il quale avrà grandi sviluppi industriali solo anni dopo con la scoperta che il cloro, prodotto di scarto dell'industria chimica, potesse essere utilizzato come economico reagente per la sua sintesi. La distribuzione di massa del PVC aumentò in maniera esponenziale durante la Seconda Guerra Mondiale. Esso, infatti, veniva utilizzato per isolare i cavi sulle navi militari; nel dopoguerra divenne una delle plastiche più utilizzate per la realizzazione di prodotti domestici e industriali. L'anno successivo Jacques Edwin Brandenberger scoprì il Cellophane, il primo materiale flessibile, trasparente e impermeabile, ampiamente utilizzato per l'imballaggio di alimenti [5].

La vera e propria ascesa delle fibre sintetiche iniziò nel 1935 quando Wallace Carothers sintetizzò la prima poliammide, messa in commercio con il nome di "Nylon". Successivamente il polietilene tereftalato (PET) ebbe un grande successo, sia come fibra tessile (*pile*) sia per la produzione di prodotti quali bottiglie di plastica per bevande. Il dopoguerra rappresentò un periodo segnato dal massiccio sviluppo di prodotti realizzati in materie plastiche, tra le più utilizzate si citano la resina melammina-formaldeide commercializzata sotto il nome "Fòrmica", utilizzata per la produzione di stoviglie e oggetti per l'arredamento a bassi costi, e il polipropilene isotattico noto come "Moplen", materiale leggero, resistente e flessibile alla cui realizzazione partecipò Giulio Natta [5]. Ad oggi PVC, polipropilene (PP) e polietilene (PE) sono tra le materie plastiche più utilizzate, insieme al polistirene (PS) impiegato per la realizzazione di imballaggi e come materiale isolante [3], [6]. In Figura 2 si riportano le materie plastiche più diffuse e i relativi settori d'impiego.

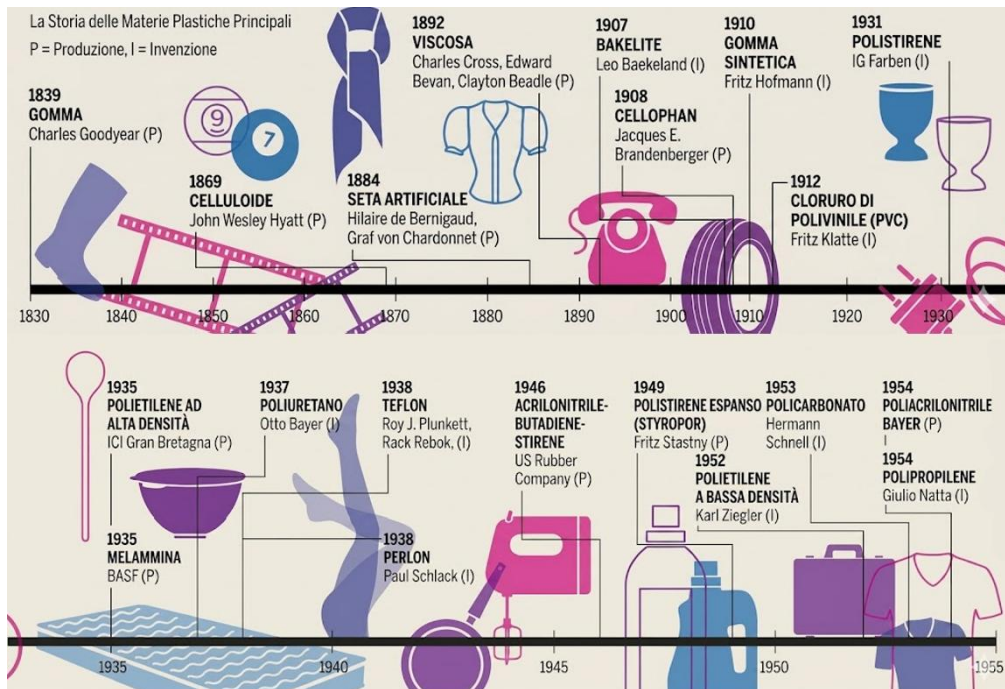


Figura 1. La storia delle materie plastiche principali [5].

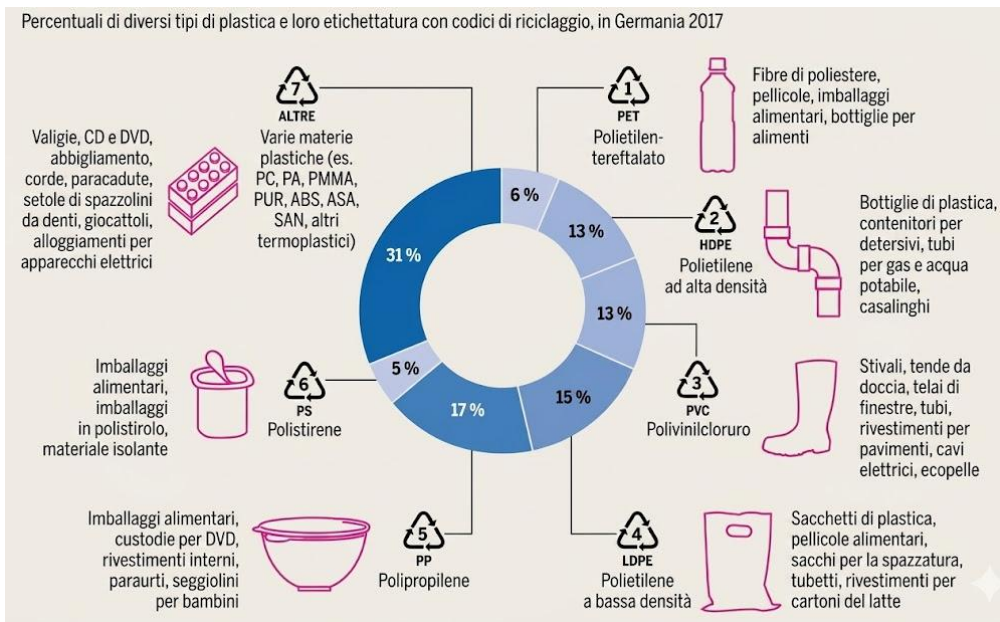


Figura 2. Le materie plastiche più diffuse e i loro impieghi [5].

2.2 Lo smaltimento dei rifiuti plastici

Durante la prima metà del XX secolo i prodotti di plastica erano progettati per essere durevoli in modo da poter essere utilizzati per un lungo periodo. Negli anni '50 l'industria, avvalendosi dell'incremento del consumo di massa, iniziò a produrre materiali destinati a un solo utilizzo avviando il graduale passaggio all'*usa e getta*. Già dal decennio successivo, la presenza di rifiuti plastici nelle discariche e negli inceneritori iniziò a rappresentare una criticità. Sebbene negli anni '80 si fosse tentato di contrastare la diffusione dei prodotti monouso mediante il riciclaggio, i Paesi a basso e medio reddito non riuscirono ad adottare sistemi di smaltimento appropriati per questi rifiuti a causa della mancanza di incentivi economici per la loro raccolta e la separazione. Ad oggi si stima che vengano prodotte 400 milioni di tonnellate di plastica l'anno e delle 8.7 miliardi di tonnellate prodotte dal 1950 al 2021 solo l'11% è stato riciclato. Il tasso di riciclaggio a livello globale si assesta attualmente al 14%; il 40% dei rifiuti plastici viene smaltito nelle discariche, il 14% negli impianti di incenerimento mentre il restante 32% risulta disperso nell'ambiente e per questo rappresenta un grave problema ambientale e sanitario [5], [7].

La combustione all'aperto di rifiuti misti rappresenta una fonte significativa di inquinamento atmosferico, portando a vari effetti negativi sull'ambiente e sulla salute umana; il 90% del *black carbon* emesso durante la combustione dei rifiuti misti è associato a materie plastiche, in particolare PET e PS [8], [9]. L'esposizione cronica al *black carbon* emesso è associata a un aumento del rischio di malattie cardiache, problemi respiratori, disturbi neurologici; inoltre alcune emissioni tossiche, tra cui gli idrocarburi policiclici aromatici (IPA), sono correlate all'insorgenza del cancro e di difetti congeniti [10-12].

Il basso tasso di riciclaggio è dovuto a differenti fattori: pratiche di raccolta scorrette e bassa selezione dei rifiuti, oppure necessità di pretrattamento o reattività chimica secondaria del polimero, che potrebbero inficiare determinati trattamenti. Il riciclo di questi rifiuti si può classificare in quattro categorie: riciclo primario, secondario, terziario e quaternario:

- Riciclo primario: è chiamato anche riciclo meccanico a circuito chiuso, questo perché il materiale recuperato viene impiegato per produrre o stesso tipo di oggetto o un prodotto equivalente. Il polimero di scarto deve essere privo di contaminanti e può essere trattato senza perdita delle proprietà originarie. Si può attuare solo se i polimeri sono termoplastici, ovvero se possono essere fusi e rimodellati più volte attraverso il calore (es.: PET, PE, PP, PVC).
- Riciclo secondario: o meccanico. Comporta la conservazione dell'identità chimica del polimero con la variazione delle proprietà a causa della scissione della catena e per le eventuali impurità della matrice. Questo metodo di riciclo si

estende anche a polimeri non termoplastici e il materiale ottenuto viene utilizzato per scopi diversi rispetto al materiale di partenza.

- Il riciclo terziario: o chimico. Utilizza processi chimici come idrolisi, pirolisi, gassificazione, o *hydrocracking*, per depolimerizzare i polimeri. I prodotti ottenuti vengono successivamente utilizzati come materia prima per la produzione di altri materiali come combustibili o altri polimeri [13].
- Il riciclo quaternario: o incenerimento, consente il recupero di energia termica o elettrica mediante la combustione dei polimeri. Sebbene comporti un recupero energetico e non di materia, viene convenzionalmente definito riciclo poiché, storicamente, si tendeva a includere tutte le forme di valorizzazione dei rifiuti in un'unica categoria. Questo metodo viene utilizzato quando i materiali plastici sono altamente contaminati e non si possono applicare altri tipi di riciclo.

Il riciclo meccanico (primario e secondario) va incontro ad alcune limitazioni quali: la degradazione termica dovuta al processo di fusione e la combinazione di calore, radiazioni, ossigeno, umidità e stress meccanico, che possono avere degli effetti sulle proprietà finali del polimero; la predisposizione di alcuni polimeri alla decomposizione sotto elevate temperature e la presenza di contaminanti, che comportano difficoltà nella gestione e nello smistamento dei rifiuti. Questi problemi hanno portato a un crescente interesse verso lo sviluppo di metodi innovativi per il riciclo chimico tramite l'impiego della fotocatalisi, delle biotecnologie e dell'elettrochimica, mettendo a punto alternative più sostenibili dal punto di vista ambientale rispetto agli approcci tradizionali [14-16].

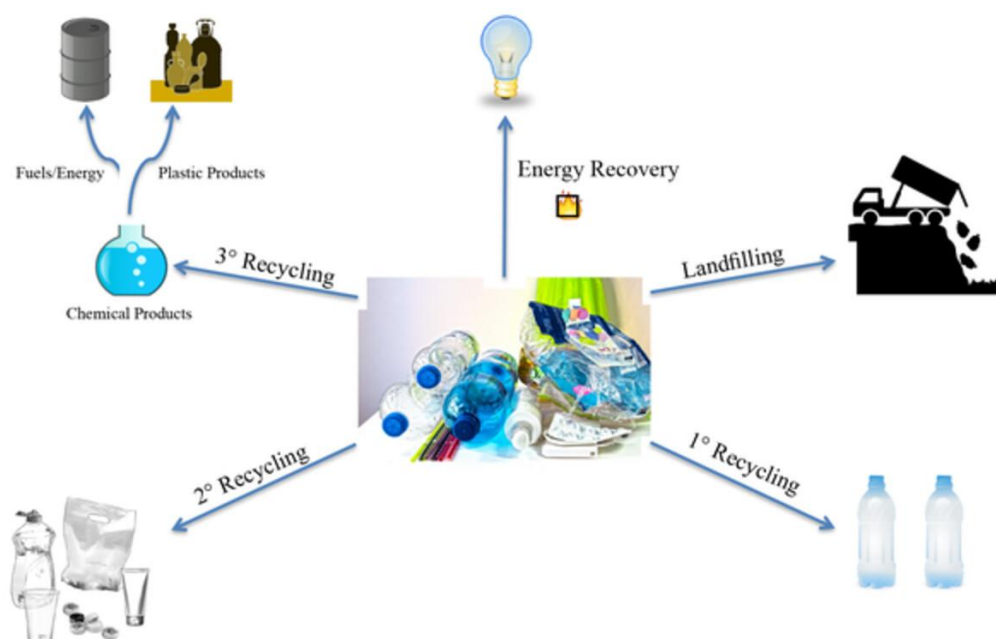


Figura 3. Riciclo dei rifiuti di plastica [13].

Nonostante i progressi compiuti in merito allo smaltimento di questi rifiuti, l'inquinamento dovuto ai detriti plastici continua a rappresentare un grave problema. La continua produzione di materiali plastici e il basso tasso di riciclaggio contribuiscono inevitabilmente all'incremento dei rifiuti già accumulati nell'ambiente marino e terrestre. Tale inquinamento altera l'equilibrio degli ecosistemi: negli ambienti marini i detriti possono impedire la corretta ossigenazione dell'acqua e ostacolare la penetrazione della luce compromettendo la fotosintesi; può avere dei gravi effetti anche sulla fauna marina e terrestre, molti animali possono ingerire i rifiuti o possono rimanere intrappolati e i detriti possono rappresentare la superficie ideale per il trasporto di specie non autoctone, ciò causa un incremento della mortalità e una riduzione della biodiversità; inoltre l'accumulo dei rifiuti determina il degrado del paesaggio naturale e urbano con ripercussioni negative su attività turistiche e di conseguenza sull'economia locale [17]. La plastica favorisce la formazione di ristagni idrici e ambienti umidi, idonei alla proliferazione di vettori di patogeni, quali artropodi come zanzare, zecche, mosche. Questo può consentire un aumento della densità delle popolazioni vettoriali e il conseguente aumento del rischio di trasmissione di malattie infettive. Allo stesso modo la superficie dei rifiuti può essere il substrato ideale per lo sviluppo di agenti patogeni e alghe nocive, portando perciò a una contaminazione dell'acqua e rappresentando un potenziale rischio per la salute umana e animale [18].

2.3 Le microplastiche

Gli oggetti di plastica dispersi nell'ambiente possono andare incontro all'azione di diversi fattori responsabili di alcuni processi di degradazione: la fotodegradazione, indotta dalle radiazioni UV, la parziale degradazione microbica, dovuta all'attività di funghi e batteri e la degradazione meccanica, causata da collisioni e stress meccanici. Le radiazioni UV possono indurre la foto-ossidazione delle poliolefine, ovvero una reazione di tipo radicalico i cui diversi stadi determinano l'incorporazione di gruppi funzionali contenenti ossigeno nelle catene polimeriche che infine provocano la scissione delle molecole, risultando anche in una riduzione del peso molecolare medio del materiale polimerico e a una conseguente variazione nelle proprietà meccaniche e ambientali. La degradazione microbica è dovuta all'azione corrosiva di particolari enzimi secreti da alcuni microorganismi; la cinetica di questo processo è solitamente lenta, per questo è considerato secondario rispetto alle altre tipologie di degradazione, seppur consistente, considerata la presenza in ambiente di rifiuti di plastica ormai da tempo [19]. La degradazione meccanica è dovuta all'azione di vento, onde e sabbia, particolarmente efficaci quando la superficie delle materie plastiche è ormai fragile a causa dell'esposizione alle radiazioni UV [20]. Questi processi consentono la formazione di frammenti di plastica, i quali vengono definiti "microplastiche" (MP) quando hanno una dimensione compresa tra 1 μ m e 5mm e "nanoplastiche" (NP) quando la loro dimensione è

inferiore a 1µm. Il presente studio e l'analisi dello stato dell'arte si focalizzeranno esclusivamente sulle microplastiche, infatti, l'estensione delle tecniche analitiche alla scala delle NP richiede ulteriori ottimizzazioni e approfondimenti metodologici che esulano dagli obiettivi di questo lavoro [21].

Sebbene la presenza di piccoli frammenti plastici nelle acque marine superficiali fosse già stata segnalata fin dagli anni '70 [22], [23], il termine microplastiche è comparso per la prima volta nella letteratura scientifica solo nel 2004. La parola fu introdotta a seguito dell'identificazione e caratterizzazione, mediante spettroscopia infrarossa (FTIR), di particelle rinvenute in campioni di sabbia costiera e in sedimenti estuari e subtidali [24].

Le microplastiche derivanti dalla degradazione dei rifiuti plastici, denominate MP secondarie, non rappresentano l'unica forma di questo inquinante nell'ambiente. Frequentemente, i materiali plastici vengono prodotti intenzionalmente con dimensioni ridotte per applicazioni industriali e commerciali, prendendo il nome di microplastiche primarie. Nel settore manifatturiero rappresentano la materia prima per la produzione di oggetti in plastica, mentre nell'industria dei trattamenti superficiali vengono impiegate come agenti per la sabbatura e l'abrasione. Il settore chimico-cosmetico ne sfrutta l'azione esfoliante inserendole nelle formulazioni di prodotti per la cura personale, come creme e dentifrici; questo impiego è ormai limitato da normative che ne proibiscono l'aggiunta come ingredienti nei cosmetici (Regolamento (UE) 2023/2055 della Commissione europea) A causa di questo utilizzo industriale e quotidiano, è possibile che, una volta scaricate, tali particelle vengano trasportate negli impianti di trattamento delle acque reflue; qui la loro dimensione ridotta, potrebbe consentire di eludere i sistemi di filtrazione, determinando il riversamento e l'accumulo negli ambienti acquatici [25], [26]. Una porzione importante dell'inquinamento da microplastiche è costituita dalle microfibre, le quali vengono rilasciate durante il lavaggio industriale e domestico di tessuti sintetici, entrando negli impianti di trattamento delle acque reflue e nelle fognature domestiche e, in seguito, diffondendosi nell'ambiente [27].

2.3.1 Interazione tra microplastiche e altri inquinanti ambientali

Le microplastiche possono interagire con gli inquinanti organici e inorganici contribuendo al loro trasporto negli ecosistemi. I meccanismi di interazione sono agevolati da processi di degradazione e invecchiamento a cui vanno incontro le particelle plastiche nell'ambiente. Tali processi comportano l'incremento dell'area superficiale delle microplastiche, principalmente attraverso la formazione di crepe, aumentando così i siti di adesione e, di conseguenza, la capacità di adsorbimento degli inquinanti.

La capacità di adsorbimento dipende da diversi fattori, che includono dimensione e grado di invecchiamento della particella, gruppi funzionali e cristallinità del polimero plastico,

concentrazione, solubilità dell'inquinante, e, per il mezzo di dispersione, salinità, pH, forza ionica e temperatura. I principali meccanismi coinvolti in tale processo, descritti nei seguenti paragrafi, sono sei: interazioni elettrostatiche, interazioni idrofobe, riempimento dei pori, forze di Van der Waals, interazioni π - π e legami a idrogeno [28].

L'interazione elettrostatica si verifica in presenza di una carica superficiale sulle particelle di plastica, la quale consente l'attrazione di contaminanti aventi carica opposta e la repulsione di quelli con la stessa carica; questo meccanismo dipende dalla costante di dissociazione acida (pK_a) del contaminante, il quale deve essere sotto forma ionica, dal pH del mezzo e dal potenziale Zeta del polimero. Quest'ultimo parametro esprime il potenziale elettrico della superficie, è rilevante nell'interazione elettrostatica e dipende fortemente dal pH. Quando il pH del mezzo di dispersione delle particelle è diverso dal punto di carica zero (pH_{pzc}) delle stesse, il valore assoluto del potenziale Zeta aumenta consentendo l'interazione con sostanze chimiche aventi una carica. Il pH_{pzc} è il valore di pH al quale la superficie di un materiale, immerso in una soluzione ha carica elettrica netta pari a zero, in questo punto le cariche negative e positive si equivalgono. I polimeri più comuni, come PE, PS e PP possiedono un pH_{pzc} intorno a 3-4.5 [29], inferiore ai mezzi di dispersione acquosi nell'ambiente. Valori di pH maggiori del punto di carica zero inducono i gruppi superficiali delle particelle a deprotonarsi, perciò la superficie presenta carica netta superficiale negativa, consentendo l'attrazione di contaminanti aventi una carica positiva, tra cui alcuni composti farmaceutici (es. propranololo (PRP), sertralina (SER)) e ioni metallici (es. Cu^{2+} , Pb^{2+}) [30], [31].

Le interazioni idrofobe descrivono l'attrazione tra due tipi di sostanze non polari, la maggior parte di polimeri sintetici rilevati nell'ambiente sono idrofobi e tendono ad adsorbire sulla superficie inquinanti idrofobi, tra cui fenoli, idrocarburi policiclici aromatici (IPA), sostanze perfluoroalchiliche (PFAS), questi ultimi caratterizzati sia da code polari sia da teste apolari e quindi capaci di andare incontro anche a interazioni elettrostatiche. Microplastiche con carattere più idrofilo, come le poliammidi (PA), mostrano invece una maggiore affinità di adsorbimento nei confronti di composti organici idrofili, come antibiotici, e una minore capacità adsorbimento di sostanze non polari rispetto a plastiche idrofobe come PE, PVC e PS [32].

Gli inquinanti possono penetrare nei pori nanometrici delle microplastiche e rimanere intrappolati al loro interno. Questo meccanismo interessa in particolar modo i polimeri vetrosi, caratterizzati da una componente amorfa rigida e con un'alta temperatura di transizione vetrosa (T_g), superiore a quella ambiente. La T_g è la temperatura oltre la quale il polimero passa ad uno stato gommoso e flessibile [33]. Infatti, mentre i polimeri vetrosi sono caratterizzati da una struttura densa e ricca di nano-pori, i polimeri gommosi (con una T_g

minore rispetto alla temperatura ambiente) presentano una struttura avente un maggiore volume libero tra le catene molecolari, in cui sono dunque favoriti altri meccanismi di adsorbimento dei contaminanti [34].

Gli inquinanti possono interagire con le particelle plastiche anche mediante interazioni intermolecolari deboli come forze di Van der Waals. Queste si verificano specialmente nei polimeri alifatici che non contengono gruppi funzionali, ad esempio il PE, per cui si hanno meno meccanismi di adsorbimento competitivi. Quando sono coinvolti polimeri aromatici, come il PS, e molecole organiche contenenti anelli aromatici, il meccanismo avviene attraverso la formazione di un altro tipo di legame debole ovvero l'interazione π - π [35]. Infine, se le MP sono composte da polimeri aventi gruppi funzionali, la loro capacità di adsorbimento degli inquinanti può aumentare grazie alla possibile formazione di legami a idrogeno tra le molecole [36].

Oltre gli inquinanti che possono essere adsorbiti dall'ambiente esterno, le MP possono contenere additivi incorporati durante la produzione delle materie prime da cui derivano, tra cui difenileteri polibromurati, nonilfenolo, bisfenolo-A, triclosano. Il principale rischio riguarda la possibilità che sia questi additivi sia i contaminanti eventualmente adsorbiti, non essendo chimicamente legati alla matrice polimerica, possano essere desorbiti dalla superficie delle particelle e rilasciati negli ecosistemi in cui le microplastiche vengono trasportate, risultando potenzialmente nocivi per gli organismi viventi [37], [38].

Un ulteriore aspetto critico associato alle microplastiche riguarda la loro capacità di fornire superfici idonee alla colonizzazione e proliferazione batterica, in particolar modo quando disperse negli ambienti acquatici. Differenti studi dimostrano la formazione di biofilm sulla superficie delle particelle e la presenza di diverse specie di batteri, comprese alcune potenzialmente patogene, tra cui batteri del genere *Vibrio*, *Pseudomonas*, ed *Escherichia coli*. Analogamente a quanto osservato per i detriti di plastica di dimensioni maggiori, anche le microplastiche possono favorire la diffusione di tali microorganismi patogeni nell'ambiente circostante, con conseguenti implicazioni per gli ecosistemi [39], [40].

2.3.2 Distribuzione delle microplastiche negli ecosistemi

Le caratteristiche di persistenza e leggerezza delle microplastiche determinano la loro capacità di essere trasportate su larga scala in diverse matrici ambientali. Diversi studi dimostrano la presenza di particelle micrometriche in matrici acquatiche, terrestri e atmosferiche.

La maggior parte degli studi si concentra sui sistemi acquatici, in particolare sull'ambiente marino, in cui questi frammenti sono stati rilevati in campioni prelevati da

diverse zone pelagiche e costiere [41-43]. Più recentemente, la ricerca si è focalizzata sulle acque reflue [44] e su acque dolci [45], [46]. È stata rilevata la presenza di MP anche in campioni di acqua dolce e del mare di Ross in Antartide, area considerata incontaminata rispetto ad altre regioni e in cui la presenza di microplastiche è facilmente imputabile al trasporto attraverso correnti oceaniche da regioni più inquinate [47], [48]. Questi tre compartimenti rappresentano in realtà un sistema interconnesso, in cui le microplastiche presenti negli impianti di trattamento di acque reflue, vengono rilasciate nell'ambiente insieme agli effluenti e queste, una volta accumulate nei corpi idrici interni, vengono convogliate verso il mare in cui si disperdono attraverso le correnti oceaniche [49].

La presenza delle MP negli impianti di trattamento di acque reflue ha un effetto negativo anche sui fanghi di depurazione esausti, in quanto essi sono utilizzati come fertilizzanti e ammendanti agricoli. I suoli vengono altresì contaminati attraverso l'utilizzo di compost contenente frammenti plastici, l'irrigazione agricola con acque reflue, la pacciamatura plastica, rifiuti di plastica abbandonati e deflusso stradale. Le microparticelle presenti sulla superficie del terreno possono essere facilmente trasportate in profondità nel suolo o in altri ecosistemi attraverso la lavorazione del terreno, la bioturbazione (ovvero il movimento del suolo causato dagli organismi) o dilavamento con acque piovane [50].

Una delle principali fonti di contaminazione delle matrici acquatiche e terrestri è rappresentata dall'atmosfera, in cui recenti ricerche dimostrano la presenza di microfibre e microparticelle. I frammenti rilasciati nell'atmosfera possono disperdersi facilmente in altri ecosistemi a causa dell'azione del vento e dell'acqua piovana, oltre che dalla sola forza gravitazionale [51], [52].

L'accumulo di microplastiche nelle varie matrici ambientali citate costituisce inevitabilmente un fattore di rischio per l'esposizione della fauna a tali inquinanti, la cui pericolosità è incrementata, come anticipato, dalla simultanea presenza di sostanze quali additivi, contaminanti e specie patogene. Numerosi studi documentano la presenza di frammenti in specie marine come il plancton, le alghe e, di conseguenza, pesci e cetacei che possono essere esposti sia all'ingestione diretta delle MP, sia all'ingestione indiretta, consumando prede contaminate lungo la catena alimentare. Inoltre, sono stati evidenziati diversi effetti negativi sulla salute di queste specie, quali stress ossidativo, accumulo in alcune zone dell'organismo, incremento dei biomarcatori infiammatori [53].

La presenza di microplastiche nei suoli e nell'atmosfera espone anche la fauna terrestre all'ingestione e all'inalazione delle particelle: gli studi in merito sono limitati, recentemente è stata dimostrata la contaminazione nei tessuti polmonari dei suini [54] e nelle feci di mammiferi come pecore, ricci europei e roditori [55], [56]. Un ulteriore fattore di esposizione

per la fauna terrestre è dovuto alla capacità delle piante commestibili di assorbire nanoplastiche attraverso percorsi fogliari e radicali [57]. I potenziali effetti negativi sull'organismo dei mammiferi sono stati valutati in numerosi studi, principalmente attraverso l'esposizione di roditori a particelle nano- e micrometriche. Sebbene alcune ricerche non evidenzino osservabili effetti negativi, altre rivelano alterazioni nei livelli di alcune molecole biologiche, potenziali effetti dannosi per la salute riproduttiva, risposte infiammatorie [58].

2.3.3 *Identificazione di microplastiche nell'organismo umano*

Alla luce della diffusione delle microplastiche in diversi contesti ambientali e della loro potenziale pericolosità, la ricerca scientifica si è progressivamente focalizzata sulla loro identificazione nell'organismo umano e sulla valutazione dei possibili effetti avversi ad esse correlati. L'esposizione alle particelle in oggetto nell'uomo può avvenire attraverso le vie respiratorie, la via orale e attraverso contatto dermico.

L'ingestione è la via più significativa dell'esposizione alle microplastiche, avviene principalmente mediante il consumo di prodotti ittici, zootecnici e agricoli contaminati, anche a causa degli imballaggi di plastica, che entrano nella catena alimentare umana [53], [59], [60]. Un contributo significativo è dato dall'utilizzo di stoviglie in plastica, le quali, sottoposte a calore e attrito meccanico, possono essere soggette a degradazione e rilasciare frammenti che possono essere potenzialmente ingeriti [61].

L'inalazione di microparticelle e microfibre costituisce un'altra via rilevante, caratterizzata non solo dall'esposizione negli ambienti esterni determinata dai frammenti sospesi nell'atmosfera, ma anche in quelli interni, in cui la concentrazione risulta essere addirittura più elevata [62], [63]. Più recentemente è stato considerato anche il contatto dermico come una via secondaria di esposizione, le microplastiche sono infatti presenti in molti prodotti per la cura personale, mentre tessuti sintetici indossati e dispositivi medici utilizzati possono rappresentarne una potenziale fonte. Tuttavia gli studi svolti in merito a quest'ultima via di esposizione sono ancora limitati e non mostrano risultati significativi, sono necessarie ulteriori indagini che tengano in considerazione ulteriori fattori aggravanti come presenza di lesioni cutanee, caratteristiche dei frammenti ed eventuale assorbimento di additivi, contaminanti e altre sostanze adsorbite da parte della cute [64].

Una volta ingerite o inalate, le microplastiche, a seconda della loro dimensione, possono penetrare negli organi e nelle strutture cellulari, fattore che ne determina la distribuzione nei vari compartimenti dell'organismo e in cui, andando incontro a condizioni differenti, potrebbero rilasciare sostanze dannose adsorbite [65].

Numerosi studi scientifici svolti su campioni biologici umani dimostrano la presenza di microplastiche in vari tessuti e fluidi. Tuttavia, l'utilizzo di differenti protocolli di preparazione e tecniche analitiche rende difficile il confronto tra i risultati. Inoltre, sebbene una parte dei campioni analizzati provenga da pazienti affetti da patologie, risulta ancora complesso stabilire una correlazione tra presenza di particelle e la patologia osservata. In Tabella 1 sono riassunti i risultati di alcune delle principali ricerche svolte su differenti tipologie di campioni biologici di origine umana.

Tabella 1. Microplastiche nel corpo umano. (Tessuto/fluido = tipologia di campione; campioni= numero di campioni analizzati; preparazione = sostanze utilizzate nella fase di preparazione del campione; metodo analitico = tecnica analitica con cui è stata effettuata l'analisi; composizione = composizione chimica dei polimeri identificati). Per la definizione delle composizioni abbreviate si rimanda all'Elenco delle sigle.

Tessuto/fluido	Campioni	Preparazione	Metodo analitico	Composizione	Riferimento
Sangue	36	H ₂ O ₂ HNO ₃	μ-FTIR	PS, PP, PE, PET, PA	[66]
	22	H ₂ O ₂	Py-GC/MS	PMMA, PP, PS, PE, PET	[67]
Placenta	18	HNO ₃	LD-IR	PA, PE, PVC, PTFE, EVA, CPE	[68]
	6	KOH	μ-Raman	PP	[69]
Colon	31	H ₂ O ₂ HNO ₃	ATR-FTIR μ-Raman	PE, PMMA, PA	[70]
Tessuto polmonare	13	H ₂ O ₂	μ-FTIR	PE, PET, PP, PES, PS, SEBS, TPE, PMMA, PUR, PTFE, PAN	[71]
	20	Corolase®7089	μ-Raman	PP, PE, PVC, CA, PA, PE/PP, PS, PS/PVC, PUR	[72]
Latte materno	34	KOH	μ-Raman	PE, PVC, PP, CPE, PVOH, PEVA, PEMA, ABS, poliestere, PC, PS, NC	[73]
Meconio	12	HNO ₃	LD-IR	PA, PU, EVA	[68]
Liquido seminale	10	KOH	μ-Raman	PP, PE, PET, PVC, PS, PC, POM, acrilico	[74]
Fegato	11	KOH NaClO H ₂ O ₂	μ-Raman	PS, PVC, PET, PMMA, POM, PP	[75]
Rene	10	KOH	μ-Raman	PE, PS	[1]
Urina	6	KOH	μ-Raman	PP, PE, PVC, EVA	[76]
	10	KOH	μ-Raman	PE, PS, stirene- isoprene	[1]

Come si evince dalla Tabella 1, nei vari studi non solo viene utilizzato un numero differente di campioni, ma sono diverse anche le tecniche analitiche utilizzate e i reagenti utilizzati per la preparazione dei campioni. Oltre la presenza di microparticelle polimeriche, alcuni studi rivelano la presenza di frammenti colorati che ne identificano il pigmento costituente. Alcuni dei pigmenti individuati sono ematite (α -Fe₂O₃) e blu di ftalocianina (C₃₂H₁₆CuN₈), entrambi utilizzati nella produzione di materie plastiche e nell'industria tessile [1], [69].

2.4 L'analisi di microplastiche in campioni reali: metodi e ostacoli

Il complesso sviluppo di protocolli operativi standard (SOP, *Standard Operating Procedure*) per l'analisi di microplastiche determina una marcata eterogeneità nei metodi che

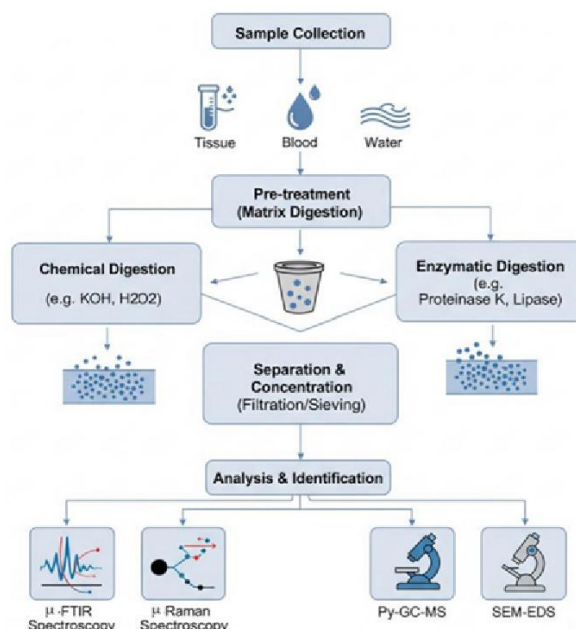


Figura 4. Fasi dell'analisi di microplastiche in campioni reali [77].

riguardano le fasi di campionamento, pretrattamento e caratterizzazione adottati dai vari laboratori [77]. Tale variabilità, riscontrabile anche su matrici identiche, compromette la comparabilità tra i risultati ottenuti e la valutazione del rischio di tali particelle. Oltre alla diversità delle fasi di preparazione del campione e delle tecniche di indagine utilizzate [78], un ostacolo critico riguarda la prevenzione della contaminazione secondaria dovuta alle microplastiche atmosferiche presenti negli ambienti di campionamento e in laboratorio. In letteratura spesso non vengono riportati dettagli sui passaggi adottati per la mitigazione di tale problema né sull'analisi di bianchi procedurali, fondamentali per monitorare la contaminazione dovuta ad attrezzatura e reagenti [79-81]. Un altro importante passaggio da adottare è rappresentato dall'analisi di controlli positivi per valutare la validità del protocollo operato; questo non è sempre possibile a causa dell'assenza di opportuni materiali di riferimento; infatti, i campioni reali sono caratterizzati da un'ampia variabilità nella dimensione, forma, colore e composizione delle microplastiche. Altri accorgimenti da adottare sono l'utilizzo di abbigliamento 100% cotone, un ambiente di lavoro pulito, l'utilizzo di reagenti filtrati o di grado analitico, possibilmente conservati in contenitori di vetro, e di cappe a flusso laminare per minimizzare la presenza di particelle aerodisperse [82].

2.4.1 Campionamento

I metodi di campionamento possono influenzare significativamente un'indagine poiché l'eventuale contaminazione da fattori esterni rappresenta un fenomeno che comporta l'inaffidabilità dei risultati ottenuti. A causa della bassa concentrazione delle microplastiche nei vari compartimenti è necessario che si raccolgano campioni rappresentativi per valutare oggettivamente il grado di contaminazione.

Per il campionamento sui sistemi acquatici attualmente vengono utilizzati metodi che prevedono l'impiego di reti da traino, pompe sommergibili e diversi sistemi di campionamento diretto. Le reti da traino consentono il campionamento di volumi significativi di acqua superficiale, ma la dimensione delle maglie (333 μm -335 μm) non consente la raccolta della frazione di microplastiche aventi dimensioni inferiori, le MP presenti vengono quantificate in numero di frammenti raccolti per area campionata o volume d'acqua. Le pompe sommergibili offrono la possibilità di campionare alti volumi a diverse profondità, di raccogliere particelle aventi dimensione ridotta (25 μm -100 μm) e infine consentono la filtrazione *in situ*, prevenendo così la contaminazione. La raccolta diretta del campione senza l'utilizzo di sistemi di filtrazione, al contrario degli altri metodi, permette di non trascurare le microplastiche più piccole; tuttavia consente di campionare un volume ridotto (500 mL) da una singola area influenzando negativamente la rappresentatività; inoltre, la necessità di filtrare il campione *ex situ* introduce il maggiore rischio di contaminazione esterna [83].

Nel suolo la deposizione e l'accumulo di microplastiche potrebbero variare significativamente; perciò, è necessario che il campione raccolto rifletta la loro distribuzione spaziale e definire una concentrazione accurata, solitamente espressa in kg^{-1} utilizzando il peso secco del campione così da prevenire possibili sottostime. A seconda della profondità di campionamento desiderata i sistemi utilizzati sono differenti, tra i più comuni vi sono pale, coclee e carotatori. È opportuno l'impiego di strumenti e sono necessari i controlli di qualità sul campo, quali la pulizia delle apparecchiature tra un campione e l'altro, per evitare ulteriori contaminazioni. La quantità di terreno campionata è variabile: in letteratura si riscontra la raccolta di quantitativi di campione che variano da 50 g a 4 kg; la raccolta di più sottocampioni di volume minore prelevati in diverse zone potrebbe favorire una migliore rappresentazione del sistema, in particolare quando questo è eterogeneo [84].

Il campionamento di microplastiche aerodisperse sfrutta approcci passivi e attivi finalizzati all'acquisizione di dati distinti. Il campionamento passivo sfrutta la deposizione gravitazionale e umida per determinare il carico ricadente al suolo, espresso in numero di particelle/ m^2 /giorno: tale metodo è fortemente influenzabile dalle condizioni meteorologiche. Quello attivo impiega pompe volumetriche per far passare l'aria attraverso dei filtri in modo

da quantificare la concentrazione atmosferica in numero di particelle/m³. I principali ostacoli nella standardizzazione del campionamento sono rappresentati dall'assenza di un parametro di quota prestabilito, che in letteratura varia da 1.5 m a decine di metri, di volume campionato (da 1 m³ a 1900 m³) e dalla dimensione dei pori dei filtri utilizzati durante i metodi di raccolta attivi [85].

La mancanza di procedure standardizzate in vigore ha un impatto significativo anche sulla raccolta di campioni biologici umani. Sebbene alcuni studi riportino procedure adottate dai ricercatori per minimizzare la possibile contaminazione, spesso le informazioni risultano superficiali, evitando una corretta valutazione dei passaggi eseguiti. Le strategie messe in pratica sono l'utilizzo di apparecchiature e contenitori privi di plastica; tuttavia, spesso i campioni non vengono raccolti dai professionisti sanitari, ma direttamente dai volontari della ricerca che forniscono i campioni, i quali dovrebbero avere a disposizione delle linee guida da seguire, riportate saltuariamente e parzialmente [79]. In letteratura si rileva anche la presenza di contenitori in plastica per la conservazione del campione, procedura che sottopone a una possibile contaminazione. Tenendo conto della dimensione generalmente ridotta delle popolazioni prese in esame nei diversi studi e all'assenza di un confronto tra campioni raccolti da individui affetti da patologie e da individui sani, talvolta non attuabile, la contestualizzazione dei dati raccolti e la valutazione dell'effettiva incidenza delle microplastiche sulle diverse condizioni cliniche risulta impossibile [79], [86].

2.4.2 Pre-trattamento del campione

I campioni analizzati per la ricerca di microplastiche, specialmente in matrice biologica, presentano un elevato contenuto di materiale organico che può ostacolare l'isolamento e la caratterizzazione accurata delle particelle. La fase di pretrattamento mira a rimuovere con elevata efficienza tale frazione tramite la digestione chimica senza alterare le caratteristiche chimico-fisiche dei polimeri. A causa della complessità e della variabilità delle matrici un singolo protocollo non risulta universalmente efficace, per questo motivo esistono diverse metodologie che prevedono l'impiego di acidi, basi, agenti ossidanti o enzimi. Si riscontra una notevole variabilità non solo nella scelta dei reagenti, ma anche nei tempi di reazione e nelle temperature adottate. La matrice biologica non solo complica l'isolamento delle particelle, ma può creare anche dei problemi durante la successiva analisi: alcuni residui potrebbero essere identificati come microplastiche durante l'ispezione visiva e potrebbero generare interferenze durante l'analisi mediante tecniche spettroscopiche.

Per la digestione acida il reagente più utilizzato è l'acido nitrico (HNO₃) al 65% o al 68%, le temperature di reazione variano dalla temperatura ambiente fino a 95°C, spesso aumentandola durante l'ultima fase del trattamento che in alcuni casi richiede più giorni,

soprattutto quando si utilizzano temperature moderate [87]. Il trattamento acido, pur dimostrando un'elevata efficienza nella rimozione della frazione biologica, potrebbe danneggiare alcune microparticelle. È stato dimostrato che la PA si degrada se sottoposta a un trattamento con HNO₃ al 65% a 60 °C per 2 ore, mentre, a temperatura ambiente, frammenti di PP e LDPE vengono solubilizzati. Inoltre, questa digestione riduce l'intensità dei segnali Raman di alcuni polimeri come PVC e HDPE.

Un'efficienza soddisfacente si ottiene anche mediante l'impiego di idrossido di potassio (KOH), il reagente più utilizzato per la digestione alcalina, applicato sia a matrici ambientali sia, prevalentemente, a matrici biologiche. I protocolli prevedono l'utilizzo di soluzioni basiche al 10% p/v, le temperature di incubazione tra 25 °C e 60 °C e tempi di reazione che si estendono fino a 7 giorni per garantire la completa rimozione dei tessuti. La digestione con questo reagente potrebbe causare la degradazione di alcuni polimeri sensibili all'idrolisi alcalina come il PET e il CA. Il perossido di idrogeno (H₂O₂) rappresenta l'agente ossidante più diffuso per il pretrattamento, similmente agli altri reagenti anche il suo utilizzo potrebbe portare alla degradazione di alcuni tipi di plastica, come PA e PVC. Viene generalmente impiegato in soluzioni aventi una concentrazione pari al 30% a temperature comprese tra i 25 °C e i 65 °C; tuttavia, la digestione dei tessuti risulta spesso lenta, richiedendo tempi di incubazione che possono estendersi per diverse settimane. Spesso lo si trova sotto forma di reagente di Fenton, una soluzione di H₂O₂ e un catalizzatore a base ferro; il suo impiego consente di velocizzare i tempi di reazione con lo svantaggio di dover monitorare il pH e mantenerlo a circa 3, ottimale per la reazione [88].

La preparazione del campione che impiega enzimi specifici risulta estremamente vantaggioso, in quanto garantisce un impatto minimo sulle microplastiche, limitando il danno alla superficie. A seconda della matrice possono essere utili diverse tipologie di enzimi, ad esempio le proteasi digeriscono proteine presenti nei tessuti e nel sangue, le lipasi vengono impiegate quando la matrice presenta grassi, le cellulasi per matrici vegetali. Il limite principale è dovuto al costo elevato degli enzimi, che incide significativamente sullo studio di campioni caratterizzati da importanti volumi. Se presenti matrici particolarmente complesse, i metodi enzimatici possono essere caratterizzati da un'efficienza inferiore rispetto ai trattamenti che impiegano reagenti più aggressivi; può essere necessario utilizzare un trattamento ossidativo lieve in seguito a quello enzimatico. Molti studi scientifici adottano un protocollo che impiega più step di digestione chimica, utilizzando la combinazione di più reagenti in modo da velocizzare il processo e incrementarne l'efficienza, con la possibilità che più frammenti plastici vengano danneggiati. È importante scegliere il protocollo da impiegare per la preparazione del campione valutando il tipo di matrice, ma anche la tecnica analitica utilizzata per la seguente individuazione e caratterizzazione [78], [79], [87], [89].

2.4.3 Separazione dalla matrice

Per poter analizzare i campioni è necessario isolare le particelle plastiche dalla matrice, a seconda della tipologia di campione ciò può avvenire anche prima del pretrattamento. Le tecniche utilizzate si basano sulla filtrazione e sulla separazione per densità.

La separazione per densità viene impiegata per separare le microplastiche da matrici inorganiche come sabbia e sedimenti. Il campione viene immerso in acqua o/e in una soluzione salina densa, i sali più utilizzati sono NaCl, ZnCl₂, NaI. I polimeri aventi bassa densità (es. PE, PP) flottano sulla superficie dell'acqua, mentre quelli con una densità maggiore (es. PS) richiedono soluzioni saline concentrate per essere separati dalle altre componenti del campione, le quali sedimentano. Il metodo può non consentire un'efficiente separazione di polimeri ad alta densità (es. PET, PVC), inoltre eventuali composti di origine biologica hanno densità paragonabili ai polimeri, perciò risulta necessario un successivo pretrattamento.

La filtrazione viene generalmente applicata dopo la preparazione direttamente su campioni liquidi che non necessitano digestione chimica. Prevede l'utilizzo di membrane filtranti con una dimensione dei pori certificata che vengono attraversate dalla matrice liquida, permettendo così la deposizione delle microplastiche sulla loro superficie. I materiali filtranti sono molteplici e sono caratterizzati da diverse proprietà chimico-fisiche, tra i materiali maggiormente impiegati vi sono fibra di vetro, policarbonato, allumina, nitrato di cellulosa, nylon [71], [74], [90]. La composizione del filtro deve essere compatibile con la tecnica analitica che si intende utilizzare; l'uso delle membrane a matrice polimerica impedisce la caratterizzazione di particelle aventi la medesima composizione oltre a generare interferenze spettrali durante le analisi spettroscopiche. Le discrepanze nella porosità delle membrane complicano il confronto tra i diversi studi, in quanto determinano differenze nella soglia dimensionale inferiore delle microplastiche trattenute [78].

2.4.4 Tecniche analitiche

A valle delle procedure di preparazione del campione, le eventuali microplastiche isolate e concentrate sulla superficie del filtro devono essere sottoposte alla fase di identificazione e caratterizzazione. Per tale scopo si utilizzano diverse metodologie, classificate in tre categorie principali in base al tipo di informazione fornita: la microscopia, fondamentale per l'analisi morfologica delle particelle; la spettroscopia, che ne identifica la composizione chimica; e la cromatografia associata alla spettrometria di massa, la quale permette di quantificare la massa polimerica complessiva. Per ottenere una caratterizzazione completa delle microplastiche analizzate è necessario adottare un approccio multi-metodo. Infatti, la sola analisi visiva richiede una validazione chimica sulla natura della particella, distinguendo i polimeri sintetici

dai residui provenienti dalla matrice e minimizzando il rischio di sovrastimare la contaminazione nel campione in esame.

2.4.4.1 Microscopia

L'analisi microscopica preliminare viene effettuata con microscopi ottici o microscopi elettronici [91]. La microscopia ottica consente l'individuazione di particelle aventi una dimensione generalmente maggiore di 1 μm ; tuttavia, risulta difficoltosa l'analisi di frammenti con dimensione ridotte e incolore. Il microscopio elettronico più utilizzato è quello a scansione (SEM), che attraverso l'impiego di un fascio collimato di elettroni riesce a scansionare la superficie del campione restituendo un'immagine ad elevata risoluzione. Il SEM permette un'analisi dettagliata della morfologia e misurazioni precise delle dimensioni anche per particelle nanometriche.

Frequentemente, il SEM è accoppiato a una sonda per la spettroscopia a raggi X a dispersione di energia (EDS), la quale consente di effettuare analisi chimiche elementari sulle particelle individuate. Il principio fisico si basa sulla rilevazione dei raggi X caratteristici emessi dagli elettroni del campione in seguito all'eccitazione indotta dal fascio elettronico primario. Sebbene la tecnica permetta la discriminazione tra composti inorganici e organici, non rende possibile la distinzione tra materia biologica e polimeri sintetici, entrambi costituiti da uno scheletro strutturale composto da carbonio e idrogeno. Risulta invece utile per rilevare la presenza di atomi contenuti in pigmenti e additivi, o di atomi presenti nella catena polimerica di alcuni materiali, come il cloro nel PVC e l'azoto nelle PA [78], [92].

2.4.4.2 Cromatografia e spettrometria

I metodi cromatografici interfacciati con la spettroscopia di massa vengono impiegati per l'analisi qualitativa e quantitativa delle microplastiche presenti nei campioni. La tecnica più diffusa è la pirolisi-gascromatografia-spettroscopia di massa (Py-GC-MS), basata sulla degradazione termica dei polimeri con la successiva separazione e identificazione. Il processo inizia con la pirolisi del campione a temperature elevate, comprese tra i 600 °C e i 1000 °C, consentendo la scissione delle catene polimeriche in frammenti più piccoli e volatili. Questi frammenti vengono successivamente separati nella colonna cromatografica e analizzati dallo spettrometro, che registra il pattern di frammentazione, caratteristico di ogni polimero. Nonostante l'elevata sensibilità e una quantificazione precisa in termini di percentuale in massa, si tratta di un metodo distruttivo e presenta il limite di non permettere la valutazione morfologica delle particelle e del loro numero totale nel campione [67], [93].

2.4.4.3 Spettroscopia vibrazionale

La caratterizzazione delle microplastiche si avvale ampiamente delle tecniche di spettroscopia vibrazionale, quali la spettroscopia infrarossa a trasformata di Fourier (FTIR) [66], [71] e la spettroscopia Raman [1], [73], [74]. Entrambe le metodologie si basano sullo studio dei livelli energetici vibrazionali accessibili ai legami chimici molecolari, operando secondo principi fisici distinti.

La tecnica FTIR misura l'assorbimento della radiazione infrarossa incidente: quando la frequenza del raggio coincide con la frequenza vibrazionale di un legame chimico, se questo può generare una variazione del momento di dipolo della molecola, allora l'energia viene assorbita. Si registra uno spettro di trasmittanza i cui segnali sono caratteristici di una specifica molecola.

La spettroscopia Raman sfrutta il fenomeno della diffusione anelastica della radiazione. Il campione viene irradiato mediante una radiazione laser diffondendo la radiazione. La tecnica si concentra sullo studio della piccola percentuale di radiazione, che, a seguito dell'interazione del campione, viene diffusa presentando una variazione di numero d'onda rispetto a quella incidente. Tale differenza è nota come *Raman shift* ed è correlabile all'energia necessaria per attivare i modi vibrazionali che inducono una variazione nella polarizzabilità della molecola. Anche in questo caso si registra uno spettro in cui l'insieme dei segnali può rappresentare univocamente le molecole analizzate.

Entrambe le tecniche possono essere interfacciate con microscopi ottici (μ -FTIR, μ -Raman), in modo da consentire sia la caratterizzazione morfologica sia composizionale delle particelle sotto indagine. La spettroscopia μ -Raman offre una risoluzione spaziale elevata ed è possibile analizzare particelle fino a 1 μm . Tuttavia, durante un'analisi μ -Raman, i segnali vibrazionali possono essere mascherati da interferenze dovute a fenomeni di fluorescenza. Ciò avviene quando il laser incidente fornisce al campione un'energia sufficiente a promuovere transizioni elettroniche, che generano segnali di intensità nettamente superiore rispetto a quelli associati alle transizioni vibrazionali, compromettendone l'osservazione [78], [79]. Questo fenomeno è particolarmente comune nei campioni che presentano residui di matrice biologica, come quelli analizzati nel presente studio.

2.5 **L'analisi di microplastiche commerciali**

Se l'analisi di microplastiche in campioni reali rappresenta un pilastro fondamentale per il monitoraggio della contaminazione ambientale e dell'esposizione, lo studio della loro ecotossicità e bio-distribuzione, dei meccanismi di degradazione e delle alterazioni delle proprietà chimico-fisiche richiede un approccio sperimentale controllato che comporta

l'utilizzo di materiali standardizzati. A tal fine, si conducono studi *in vivo* e *in vitro* impiegando micro e nanoplastiche commerciali. L'uso di questi materiali standardizzati permette di stabilire relazioni dose-risposta e di simulare processi di invecchiamento e interazione che potrebbero avvenire nei vari ecosistemi.

2.5.1 Valutazione dell'ecotossicità e della bio-distribuzione

L'impiego di microplastiche standardizzate negli studi *in vivo* e *in vitro* permette di valutare la bio-distribuzione, cioè la distribuzione nei diversi tessuti e organi nel tempo, e gli effetti tossicologici di questi contaminanti non solo sulla salute umana e animale, ma anche sulla vegetazione acquatica e terrestre. Sebbene inizialmente la ricerca si sia concentrata su modelli murini, ovvero roditori, per stimare i potenziali rischi per l'uomo, attualmente la prospettiva si è ampliata verso la fauna marina e la flora. Si investigano fenomeni come la traslocazione delle particelle nei tessuti vegetali e l'accumulo lungo le catene trofiche [57], [94], [95]. Inoltre, spesso l'utilizzo delle microplastiche è abbinato a quello di inquinanti per poter valutare anche il loro ruolo da “*carrier*” all'interno di questi organismi [96].

I protocolli sperimentali *in vivo* sono strutturati per sottoporre i modelli biologici a regimi di esposizione controllati, variando la composizione polimerica, la concentrazione e la durata del trattamento. La composizione delle popolazioni sperimentali spesso include entrambi i sessi; approccio necessario per identificare eventuali variazioni nelle risposte fisiologiche legate al dimorfismo cellulare, che può influenzare la suscettibilità a determinati contaminanti [97]. Le ricerche tendono a focalizzarsi su specifici sistemi fisiologici, monitorando gli impatti sul sistema digestivo, cardiovascolare, nervoso, respiratorio, riproduttivo. La somministrazione orale è la via di esposizione più indagata, questo non solo perché ha un'importante rilevanza nelle condizioni reali, ma anche perché permette un maggiore controllo sulla reale dose somministrata. Nei modelli sperimentali *in vivo* vengono impiegate microplastiche preventivamente marcate con traccianti fluorescenti, in modo da indagare l'accumulo tissutale tramite microscopia a fluorescenza. Parallelamente, vengono eseguiti test bio-chimici per valutare effetti biologici avversi, come stress ossidativo, danni cellulari, infiammazioni nei vari compartimenti dell'organismo [98].

La ricerca *in vitro* permette di indagare i meccanismi biologici alla base della tossicità delle microplastiche. Si utilizzano linee cellulari (umane o animali) derivate dai tessuti che sono maggiormente esposti alle microplastiche, come cellule epiteliali intestinali, cellule polmonari, cellule del sistema immunitario. Anche in questo modo si possono indagare i meccanismi di stress ossidativo e della risposta infiammatoria, ma anche l'internalizzazione cellulare, il rilascio di additivi o contaminanti precedentemente adsorbiti sulla superficie delle microplastiche impiegate. Inoltre, questo metodo permette di ridurre l'utilizzo di animali da

laboratorio, con il limite di non poter replicare la complessità di un organismo vivente. Gli studi *in vitro* non permettono di indagare l'interazione tra i diversi sistemi e non permettono di osservare possibili effetti della somministrazione a lungo termine e le eventuali variazioni comportamentali visibili nei modelli *in vivo* [98].

2.5.2 *Degradazione simulata*

L'impiego di microplastiche standard è essenziale anche per lo studio dei meccanismi di degradazione. In questo modo non solo è possibile comprendere il destino ambientale di questi contaminanti, ma anche valutare potenziali metodi di degradazione ecologica volti a ridurre l'accumulo di tali inquinanti negli ecosistemi. La ricerca si focalizza sull'esposizione di microplastiche standard a specifici batteri o funghi isolati da ambienti ad alta attività microbica, come suoli, discariche o alcuni artropodi. Inoltre, mediante tale approccio, è stata dimostrata anche l'efficacia nella rimozione delle MP di alcuni ceppi algali isolati da sistemi di trattamento delle acque reflue. Vari studi dimostrano la validità dell'esposizione a batteri e funghi in combinazione a condizioni abiotiche (radiazione UV, pH, temperatura, ossigenazione), che possono rendere la degradazione più veloce. Le variazioni delle proprietà chimico-fisiche dovute alla degradazione vengono monitorate mediante le consuete tecniche utilizzate per l'analisi dei campioni reali, quali FTIR, Raman, SEM, ma anche attraverso una tecnica fondamentale per lo studio di particelle micro e nanometriche, ovvero la tecnica DLS, descritta nel paragrafo 3.4.2 [99], [100].

Lo studio dei possibili meccanismi di degradazione su diverse tipologie di polimeri assume un ruolo importante anche nella validazione metodologica delle procedure di preparazione dei campioni. L'utilizzo di microplastiche commerciali permette di valutare l'efficacia degli agenti chimici utilizzati per la digestione della matrice organica. L'obiettivo è identificare il reagente ottimale capace di garantire la massima rimozione dei residui biologici senza compromettere l'integrità dei frammenti plastici [88], [89]. Inoltre, l'impiego di standard commerciali consente di quantificare il tasso di recupero, calcolando l'eventuale perdita di particelle durante i vari passaggi del processo analitico [101].

2.5.3 *Analisi delle proprietà chimico-fisiche mediante tecnica DLS*

La tecnica *Dynamic Light Scattering* si basa sulla diffusione dinamica della luce e, attraverso lo studio dell'interferenza del raggio di luce dovuta al moto browniano delle particelle sospese in un liquido, permette di stimare il valore del diametro idrodinamico delle particelle disperse nel mezzo. La strumentazione impiegata consente spesso l'integrazione della tecnica elettroforesi Laser Doppler, finalizzata alla misurazione del potenziale zeta (ZP),

che valuta la variazione nella mobilità elettroforetica delle particelle in funzione del loro potenziale Zeta quando è applicato un campo elettrico esterno.

La combinazione di queste due proprietà permette di valutare la dimensione e la stabilità colloidale delle micro e nanoplastiche nel mezzo di dispersione. Per tale motivo risulta uno strumento adatto a monitorare i processi di degradazione, durante i quali è possibile osservare una riduzione del diametro idrodinamico medio, segno della frammentazione del polimero in unità più piccole. Inoltre l'alterazione della chimica superficiale si riflette in una variazioni del potenziale Zeta [100]. Tale parametro non indica solo lo stato di degradazione, ma è un importante mezzo per valutare la tendenza delle microplastiche all'aggregazione e all'adsorbimento di contaminanti; per questo è un buon mezzo di analisi da utilizzare in ricerche che monitorano l'interazione tra microplastiche e sostanze chimiche [102].

Un'altra applicazione di questa tecnica è lo studio della stabilità colloidale delle particelle nei vari sistemi che caratterizzano i campioni reali, come acqua di mare o fluidi biologici. Per tale scopo vengono utilizzati inizialmente dei campioni modello che rappresentino il più possibile i mezzi di dispersione reale [103], [104]. Un'ulteriore applicazione è il monitoraggio delle proprietà delle microplastiche nei mezzi utilizzati per la cultura cellulare [105]. L'impiego di questa tecnica è caratterizzato da molte sfide, tra le quali vi sono: la critica preparazione del campione e la complicata interpretazione dei dati. Tra le difficoltà dei metodi di preparazione dei campioni vi è la necessità di utilizzare particelle sferiche e incolore e campioni diluiti, questo rappresenta un problema quando si devono riprodurre delle matrici ambientali [106]. Tale procedura comporta inevitabilmente la variazione delle proprietà chimico-fisiche del mezzo, quali viscosità, pH e forza ionica, che influenzano direttamente il diametro idrodinamico e lo stato di aggregazione delle particelle. Per questo motivo, non si è ancora in grado di rappresentare adeguatamente matrici reali complesse. Queste necessità, unite all'impossibilità di identificare la natura chimica delle particelle, rendono la tecnica inadatta per la caratterizzazione di campioni reali. Un esempio significativo è rappresentato da una ricerca condotta su campioni di tessuto umano (tra cui celebrale, polmonare, renale, cardiaco) post-mortem, dove il DLS è stato impiegato per confermare la presenza di microplastiche e determinarne il range dimensionale nei filtrati dopo il trattamento dei campioni, in modo da poter verificare la presenza di ulteriori particelle passate attraverso membrana filtrante [107].

3 MATERIALI E METODI

Lo studio si focalizza sulla ricerca e l'identificazione di microplastiche in due differenti matrici cliniche, quali i fluidi per la dialisi peritoneale e i condensati dell'aria espirata (EBC, *Exhaled Breath Condensate*), tramite l'uso della spettroscopia μ -Raman. Al fine di valutare la bontà del protocollo di preparazione dei campioni e di identificazione delle particelle e per escludere eventuali contaminazioni, l'indagine è stata estesa anche a una serie di campioni di riferimento (bianchi). Inoltre, sono state analizzate diverse tipologie di membrane filtranti e di supporti che possono essere impiegati nella preparazione dei campioni per l'analisi spettroscopica, sia per escludere eventuali contaminazioni secondarie, sia per valutare il possibile contributo del *background* spettrale nelle successive analisi. Sui supporti sono state inoltre disperse microsfele commerciali di polietilene (1-4 μm , *Cospheric*, Santa Barbara, CA, USA), utilizzate come standard di riferimento per testare l'idoneità del metodo utilizzato per l'analisi.

Prima di svolgere l'analisi sui campioni reali, sono state analizzate anche alcune aliquote dell'acqua deionizzata impiegata durante la pulizia della vetreria e durante il processo di preparazione del campione, per escludere possibili contaminazioni secondarie.

In parallelo, mediante le tecniche di *Dynamic Light Scattering* e *Laser Doppler Electrophoresis*, è stata condotta la caratterizzazione chimico-fisica delle microplastiche standard di polietilene e di polistirene (Microparticelle di dimensione standard a base di Polistirene monodisperse, 1 micron, *Merck KGaA*, Darmstadt, Germania) in sospensione. I campioni sono stati preparati sia in acqua deionizzata, sia in soluzioni a pH controllato, variato mediante l'aggiunta di soluzioni acquose di KOH 0.1 M e HNO₃ 0.1 M. Questo approccio ha permesso di valutare non solo l'influenza della concentrazione di particelle e della temperatura del mezzo, sulla stabilità e sulle proprietà delle particelle, ma anche gli effetti dell'acidità e della basicità.

Le particelle standard di polietilene e polistirene sono state caratterizzate anche attraverso microscopia elettronica a scansione (SEM), in modo da verificare la dimensione delle particelle e la loro sfericità, valutando le possibili variazioni dovute all'esposizione ad ambienti fortemente acidi e basici.

3.1 Fluidi per la dialisi peritoneale

L'indagine relativa ai fluidi per la dialisi peritoneale ha riguardato cinque differenti tipologie di soluzioni, selezionate in base alla loro composizione chimica. Nello specifico, il set di campioni ha compreso quattro soluzioni a base di glucosio, con concentrazioni pari a 1.36%, 2.27%, 3.86% e 4.25% e una soluzione contenente icodestrina (Extraneal®, Baxter)

come agente osmotico alternativo. La selezione di queste specifiche composizioni è legata al loro ruolo clinico; esse costituiscono i principali agenti osmotici prescritti per la dialisi peritoneale. In particolare, le soluzioni a base di icodestrina sono utilizzate per le terapie prolungate: essendo assorbite più lentamente permettono uno scambio osmotico costante evitando l'eccessivo carico glicemico tipico del glucosio. In totale sono stati analizzati 7 campioni da 600 mL e 9 campioni da 2 L.

Lo studio spettroscopico ha previsto un'iniziale caratterizzazione dei polimeri costituenti le diverse componenti delle sacche di stoccaggio e del sistema di trasporto dei fluidi, permettendo di stabilire un riferimento fondamentale per identificare eventuali fenomeni di contaminazione dovuti al *packaging* primario o al sistema di somministrazione. Inoltre, sono stati acquisiti gli spettri di riferimento dei residui di cristallizzazione delle soluzioni, poiché sia il glucosio sia l'icodestrina sono composti Raman-attivi. Questa procedura si è resa necessaria per distinguere i segnali attribuibili ai soluti da quelli polimerici riconducibili a eventuali microplastiche, escludendo la possibilità che eventuali residui derivanti dalla matrice potessero essere erroneamente identificati come frammenti di plastica.

3.1.1 Valutazione della membrana filtrante idonea per i fluidi da dialisi peritoneale

Per i campioni di fluido da dialisi si è scelto di procedere all'analisi spettrale previa filtrazione dei campioni. A tal fine sono stati valutati diversi supporti a matrice polimerica: politetrafluoroetilene (PTFE) (Fluoropore™, Filtri a membrana in PTFE, Merck Millipore, Carrigtwohill, Irlanda) polieteresulfone (PES) (Millipore Express® PLUS, Filtri a membrana in PES, Merck Millipore, Carrigtwohill, Irlanda) e polivinildenfluoruro (PVDF) (Durapore®, Filtri a membrana in PES, Merck Millipore, Carrigtwohill, Irlanda). La scelta di questi specifici materiali è stata dettata dalla loro bassa ricorrenza come contaminanti nei campioni reali riportati in letteratura, minimizzando il rischio di sovrapposizione spettrale tra il supporto e le eventuali microplastiche aventi medesima composizione del filtro. Inoltre, prima di testare tali supporti, sono state condotte prove preliminari su filtri non polimerici, quali lana di vetro, risultati inadeguati a causa di diverse criticità sperimentali. Nello specifico, il materiale ha mostrato una scarsa stabilità termica sotto il fascio laser e una significativa interferenza spettrale. Inoltre, la struttura del filtro tendeva a intrappolare le particelle all'interno del proprio volume anziché trattenerle sulla superficie, impedendo la seguente caratterizzazione spettroscopica.

Tutte le membrane utilizzate presentano un diametro di 25 mm e dimensione dei pori pari a 0.22 μm , dimensione ideale per garantire la ritenzione anche dei frammenti polimerici più fini presenti nei campioni.

Per ciascuna tipologia di membrana sono stati selezionati casualmente tre filtri dalla confezione originale, e sottoposti a indagine visiva, impiegando il microscopio ottico dello spettrometro. Tale ispezione ha confermato l'omogeneità della superficie dei filtri e l'assenza di eventuali frammenti microscopici già presenti sui filtri prima dell'utilizzo. Successivamente, è stato raccolto uno spettro Raman per ciascuna tipologia di filtro; questo ha permesso di definire la potenza del laser ottimale per garantire la stabilità del filtro durante l'analisi e di raccogliere uno spettro di riferimento del materiale. La registrazione di tale spettro è stata essenziale per valutare il contributo del *background* nelle successive analisi sui campioni reali.

3.1.2 Preparazione dei campioni di fluidi di dialisi

La prima serie di campioni di fluidi da dialisi è stata preparata presso il Dipartimento di Medicina interna e Specialità Mediche dell'Università degli Studi di Genova (Di.M.I). Il protocollo sperimentale ha previsto l'eliminazione di materiali plastici, sostituiti da attrezzature in vetro. Per ridurre la contaminazione dovuta alle particelle aerodisperse è stata utilizzata una cappa a flusso laminare, che ha il compito di ridurre il carico particellare sospeso, durante la fase di asciugatura dei filtri. Al contrario, le operazioni di filtrazione sono state eseguite sul bancone. Per monitorare l'eventuale deposizione di microplastiche aerodisperse e valutare il contributo di contaminazione secondaria derivante dall'acqua deionizzata, sono stati preparati tre campioni filtrando 50 mL di acqua deionizzata. Il set sperimentale ha compreso soluzioni a diversa concentrazione di glucosio (due campioni all'1.36%, uno al 2.27%, due al 3.86%) e due campioni di Extraneal. Da ogni sacca, avente un volume di 2 L, sono state prelevate 3 aliquote da 200 mL, corrispondenti a tre diverse frazioni di svuotamento (iniziale, intermedia e finale). Successivamente, le tre frazioni sono state accorpate in un campione unico rappresentativo, il quale è stato sottoposto a filtrazione sottovuoto mediante una pompa da vuoto ad acqua. Come supporto per la ritenzione delle particelle eventualmente presenti nei campioni è stata impiegata una membrana in PTFE, selezionata in base ai risultati dello *screening* preventivo. Al termine del passaggio del fluido, i filtri sono stati sottoposti a tre lavaggi con acqua deionizzata (per un volume totale di circa 50 mL) al fine di rimuovere eventuali residui di soluto prima della loro cristallizzazione sulla superficie. Infine, le membrane sono state trasferite all'interno della cappa a flusso laminare e lasciate ad asciugare a temperatura ambiente.

Una seconda serie di campioni è stata successivamente preparata presso il Dipartimento di Chimica e Chimica Industriale (D.C.C.I.) dell'Università degli Studi di Genova, dove è stato possibile ottimizzare la procedura di preparazione adoperando accorgimenti utili, ritenuti necessari a seguito dell'analisi svolta sul set di campioni descritto in precedenza. L'intero processo di filtrazione, in questo caso, è stato condotto all'interno di una cappa a flusso laminare, sfruttando una pompa da vuoto meccanica posta sotto cappa. Il *setup* sperimentale (Figura 5) ha consentito la filtrazione dell'intero volume contenuto nelle sacche, pari a 2 L, garantendo una caratterizzazione totale del fluido.

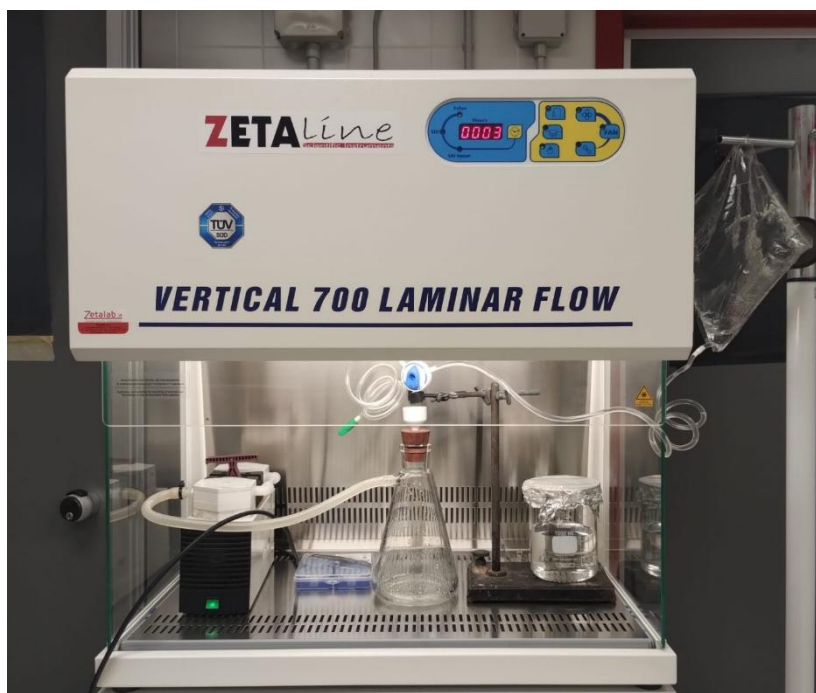


Figura 5. *Setup* sperimentale per il processo di filtrazione dei campioni di fluidi da dialisi presso il D.C.C.I..

Anche in questo caso sono stati preventivamente preparati tre campioni di acqua deionizzata. Inoltre, è stata implementata una fase di pre-filtrazione dell'acqua deionizzata su membrane di PTFE prima di essere impiegata per il lavaggio dei filtri. Prima di procedere, l'esito di tale procedura è stato valutato mediante la preparazione e successiva analisi di ulteriori tre campioni dopo la filtrazione.

Parallelamente, è stata condotta una valutazione comparativa su membrane filtranti a diversa composizione polimerica, indagando sulla loro idoneità all'analisi di campioni di questo tipo. L'impiego di diversi supporti ha consentito di individuare la membrana più efficace in termini di qualità dell'identificazione visiva al microscopio e capacità di minimizzare le interferenze spettrali. Perciò, per la seconda serie di campioni, sono state

utilizzate due membrane filtranti a diversa composizione, ovvero PTFE e PES. I filtri in PTFE sono stati impiegati per soluzioni di glucosio all'1.36%, al 2.27%, al 3.86% e 4.25% e per un campione di Extraneal. Le membrane in PES sono state adoperate per ulteriori campioni di glucosio all'1.36%, al 2.27% e 4.25% ed Extraneal.

3.2 Exhaled Breath Condensate (EBC)

Sono stati analizzati due campioni di condensato dell'aria espirata (EBC) provenienti da pazienti affetti da differenti patologie dell'apparato respiratorio. Il campione è stato raccolto mediante l'impiego di un dispositivo caratterizzato da un boccaglio dotato di una trappola salivare e un tubo, il tutto in polipropilene, che devia il flusso di aria espirata all'interno di una provetta Falcon posta all'interno di una camera refrigerante (Figura 6) [108]. La refrigerazione permette la condensazione dell'aria sulle pareti della provetta e, di conseguenza, la raccolta del suo condensato, caratterizzato da un volume di circa 1.5 mL.



Figura 6. Dispositivo per la raccolta del campione di EBC, caratterizzato da boccaglio e provetta Falcon (a sinistra) e dalla camera refrigerante (a destra) [108].

Anche in questo caso i campioni non hanno subito un pretrattamento e, a causa del volume ridotto del campione, non è stata ritenuta necessaria la fase di filtrazione. È stato selezionato un supporto adeguato su cui depositare il campione per la successiva analisi, cercando caratteristiche come una superficie sufficientemente uniforme, non polimerica, con segnali Raman noti e deboli.

3.2.1 Valutazione del supporto ottimale

Al fine di eliminare le possibili interferenze spettrali derivanti dall'utilizzo di membrane a matrice polimerica, lo studio ha previsto la valutazione dell'idoneità di due differenti supporti inorganici: una membrana filtrante in silicio monocristallino (10 x 10 mm, diametro dei pori 1 μm) (Makropor, Membrana in silicio, Merck Millipore, Carrigtwohill, Irlanda) e un disco in allumina (Al_2O_3) (Figura 7). Sul disco in allumina è stato precedentemente applicata una fase di lavaggio con soluzione detergente seguita da dei risciacqui con acqua deionizzata pre-filtrata.



Figura 7. Supporti in silicio monocristallino (a sinistra) e in allumina (a destra).

L'indagine preliminare è stata condotta mediante microscopia ottica per mappare la morfologia superficiale e identificare eventuali particelle contaminanti già presenti sui supporti. Questa fase ha evidenziato la necessità di sottoporre la membrana in silicio a un protocollo di pulizia specifico. Tale trattamento è stato eseguito mediante immersione del supporto in acido nitrico (HNO_3) al 65% assistita da un'azione meccanica in bagno a ultrasuoni per la durata di un'ora. Al termine del processo, la membrana è stata risciacquata con acqua deionizzata pre-filtrata.

Sulla superficie di entrambi i materiali sono state successivamente depositate alcune gocce di una sospensione acquosa di microsferi di polietilene standard (1-4 μm), con lo scopo di testare l'efficacia della tecnica μ -Raman nell'identificazione di microplastiche utilizzando tali supporti. Sia la fase di deposizione che la fase di deposizione e la successiva asciugatura sono state condotte all'interno della cappa a flusso laminare.

3.2.2 Preparazione dei campioni di EBC

Per quanto riguarda la preparazione dei campioni di EBC, il liquido all'interno delle provette Falcon è stato prelevato mediante una pipetta Pasteur e posto sulla superficie del supporto in allumina. Anche in questo caso per la preparazione del campione e per

l'evaporazione della matrice liquida a temperatura ambiente è stata impiegata una cappa a flusso laminare al fine di minimizzare l'interferenza di contaminanti atmosferici.

3.3 Sospensioni di microplastiche standard

Per la determinazione del diametro idrodinamico e del potenziale Zeta sono state preparate delle sospensioni acquose con H₂O deionizzata pre-filtrata, come illustrato per i campioni reali, di microsfele standard di polietilene, con range dimensionale tra 1 µm e 4 µm, e di polistirene (PS) monodisperse con diametro di 1 µm. Al fine di investigare l'influenza delle proprietà del mezzo sulla stabilità delle particelle, i campioni sono stati preparati a diverse concentrazioni e differenti pH, quest'ultimo variato utilizzando delle soluzioni idrossido di potassio (KOH) e acido nitrico (HNO₃) con concentrazione 0.1 M.

Le misure DLS ed LDE sono state condotte inserendo i campioni all'interno di specifiche cuvette monouso: per le misure di diametro idrodinamico è stata utilizzata una cuvetta in polistirene (DTS0012), per quelle di potenziale Zeta una cella elettroforetica capillare in policarbonato dotata di due elettrodi in rame-berillio rivestiti in oro (DTS1060) (Figura 8).



Figura 8. Cuvette per la misura del diametro idrodinamico (a sinistra) e del potenziale Zeta (a destra).

3.3.1 Preparazione della soluzione acida e basica

Per modulare il pH delle sospensioni di polietilene e di polistirene sono state preparate due soluzioni di idrossido di potassio (KOH) e di acido nitrico (HNO₃) con concentrazione 0.1 M. Le preparazioni sono state effettuate utilizzando matracci tarati da 500 mL.

La soluzione basica è stata ottenuta pesando su bilancia analitica 3.058 g di KOH in gocce all'interno di un becher in vetro da 250 mL. Il solido è stato solubilizzato con acqua deionizzata e trasferito quantitativamente nel matraccio da 500 mL, successivamente portato a volume. Il pH della soluzione è stato misurato mediante pHmetro che ha restituito un valore pari a 13.02.

Per la soluzione acida, sono stati prelevati 3.5 mL di HNO₃ al 65% p/p mediante l'impiego di un cilindro graduato in vetro da 5 mL. L'acido è stato aggiunto nel matraccio da 500 mL contenente una quota di acqua deionizzata, in modo da evitare reazioni esotermiche, e infine portato a volume. Anche per questa soluzione il pH, pari a 1.16, è stato misurato impiegando un pHmetro (pH 7110 Benchtop Meter, WTW inoLab®).

3.3.2 Preparazione dei campioni di polietilene

Per la preparazione del set di campioni di polietilene è stata utilizzata una soluzione madre con concentrazione pari a 1 mg/mL, ottenuta trasferendo 25.0 mg di particelle standard, pesati mediante bilancia analitica, in un matraccio da 25 mL, portando a volume con H₂O e trattando la sospensione con un bagno a ultrasuoni al fine di renderla uniforme. Le sospensioni analizzate sono state diluite a concentrazioni di 0.5, 0.25, 0.1, 0.05, 0.025 e 0.01 mg/mL. La diluizione è stata effettuata prelevando, attraverso opportune pipette e micropipette, rispettivamente 5, 2.5, 1, 0.5, 0.25, 0.1 mL di soluzione madre e portandoli a volume in un matraccio da 10 mL con H₂O. Tali campioni sono stati sottoposti solo ad analisi DLS, in modo da monitorare la riproducibilità della risposta strumentale ed eventuali risposte anomale dovute a concentrazioni non ottimali per questo tipo di misurazioni.

Inoltre, sono state preparate delle sospensioni con concentrazione 0.25 e 0.1 mg/mL a differenti pH. Le sospensioni a pH 1 sono state preparate disperdendo rispettivamente 1.25 e 0.5 mL di soluzione madre in 5 mL di HNO₃ 0.1 M, mentre quelle a pH 13 sono state ottenute disperdendo i medesimi volumi di soluzione madre in 5 mL di KOH 0.1 M. Per i campioni a pH intermedi sono state inizialmente preparate due sospensioni alle concentrazioni interessate, portando a volume 6.25 mL e 2.5 mL di soluzione madre in matracci da 25 mL, da cui sono state prelevate 5 aliquote da 5 mL. A ogni aliquota è stata effettuata un'opportuna aggiunta di KOH o di HNO₃ 0.1 M. Il pH è stato monitorato attraverso un pHmetro fino ad arrivare a valori pari a 3, 5, 7, 9, 11.

I campioni a pH variabile, esposti in Tabella 2 sono stati trasferiti nelle opportune cuvette e sottoposti alle analisi DLS ed LDE.

Tabella 2. Campioni di PE a pH variabile analizzati.

Concentrazione (mg/mL)	pH						
	0.1	1.28	3.08	5.13	7.10	9.23	11.03
0.25	1.55	3.36	5.06	7.03	9.11	11.01	13.02

3.3.3 Preparazione dei campioni di polistirene

I campioni di polistirene sono stati preparati a partire da una sospensione standard commerciale di microsferi monodisperse (ovvero caratterizzate da un'unica popolazione dimensionale) con diametro pari a 1 μm e con concentrazione 105 mg/mL. A partire da tale sospensione sono state effettuate delle diluizioni in serie in scala 1:10 al fine di ottenere delle concentrazioni pari a 10.5, 1.05, 0.105, 0.0105 e 0.00105 mg/mL,

Le procedure di diluizione sono state eseguite in *vial* in vetro seguendo tale procedura:

- La prima diluizione (10.5 mg/mL) è stata ottenuta prelevando mediante micropipetta 0.2 mL della soluzione madre e disperdendola in 2 mL di H₂O.
- Le concentrazioni successive sono state preparate in modo analogo, utilizzando ogni sospensione appena ottenuta come base per la diluizione successiva.

I campioni così ottenuti e la soluzione madre sono stati trasferiti nella cuvetta e sottoposte ad analisi DLS per indagare sull'effetto della concentrazione sul risultato fornito dall'analisi.

Successivamente è stata preparata un'ulteriore aliquota con concentrazione 10.5 mg/mL impiegata in seguito per la preparazione di sospensioni con concentrazione 0.105 mg/mL. 50 μL della soluzione 10.5 mg/mL sono stati prelevati mediante micropipetta e sospesi in 5 mL di H₂O. In questo modo sono stati ottenuti 13 campioni, a uno di essi non è stata effettuata alcuna aggiunta ed è stato utilizzato per svolgere delle misure di DLS ed LDE in funzione della temperatura. Ai restanti 12 sono è stata aggiunta un'opportuna quantità di KOH o HNO₃ al fine di variare il pH, monitorato attraverso il pHmetro, ottenendo i seguenti valori: 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12 (Tabella 3). I campioni sono stati sottoposti ad analisi DLS ed LDE.

Tabella 3. Campioni di PS a pH variabile analizzati.

Concentrazione (mg/mL)	pH					
0.105	2.09	3.27	4.12	5.17	6.24	7.02
	8.17	9.33	10.04	11.03	12.06	

3.4 Tecniche di caratterizzazione

3.4.1 Spettroscopia micro-Raman

La spettroscopia Raman è una tecnica di analisi vibrazionale non distruttiva basata sui fenomeni di diffusione (*scattering*) che si verificano a seguito dell'interazione tra la radiazione elettromagnetica monocromatica incidente e la materia. Quando questa radiazione, in uscita da una sorgente laser, colpisce una molecola, la maggior parte dei fotoni viene diffusa elasticamente, dando luogo alla diffusione Rayleigh. In questo caso, non avviene alcuno scambio di energia tra i fotoni incidenti e la materia, e la radiazione diffusa dal campione mantiene la medesima frequenza di quella incidente. Tuttavia, una frazione di fotoni (10^{-4} – 10^{-6} %) interagisce anelasticamente con la molecola, sollecitandone i modi vibrazionali. Questo fenomeno, noto come diffusione Raman, comporta uno scambio di energia tra fotone e materia che si manifesta in due modalità:

- la diffusione Stokes, che si verifica quando la molecola impiega l'energia ceduta dal fotone per passare dallo stato vibrazionale fondamentale a uno stato virtuale di energia più elevata, con conseguente diffusione della radiazione con energia e frequenza inferiori a seguito del suo rilassamento;
- la diffusione anti-Stokes, che si verifica quando la molecola si trova già in uno stato vibrazionale eccitato e, per tornare al suo stato allo stato fondamentale, cede energia al fotone, che sarà diffuso con una frequenza maggiore rispetto a quella incidente.

A temperatura ambiente, secondo l'equazione di Boltzmann (Equazione 1), lo stato fondamentale è il più popolato: per tale motivo le transizioni di Stokes sono molto più frequenti e intense.

$$\frac{N_e}{N_f} = e^{-\frac{\Delta E}{T k_B}}$$

Equazione 1. Equazione di Boltzmann. (N_e = popolazione sullo stato eccitato; N_f = popolazione sullo stato fondamentale; ΔE = differenza di energia tra gli stati energetici; T = temperatura; k_B = costante di Boltzmann)

Affinché una molecola sia analizzabile mediante questa tecnica, le regole di selezione richiedono che essa sia “Raman-attiva”, la vibrazione deve provocare una variazione della polarizzabilità (α) della molecola, ovvero la densità elettronica molecolare deve tendere a modificarsi in presenza di un campo elettrico esterno. Il segnale ottenuto viene elaborato in funzione del *Raman Shift* ($\Delta\tilde{\nu}$) espresso in numeri d’onda (cm^{-1}), che corrisponde alla differenza in numeri d’onda tra la radiazione incidente e quella diffusa. Ciascun segnale osservato in uno spettro corrisponde ad uno dei modi vibrazionali dei legami presenti nella molecola in esame ed è caratterizzato da una certa intensità, espressa in unità arbitrarie. Lo spettro risultante rappresenta l’“impronta digitale” univoca di ciascuna molecola; questa, se ignota, può essere identificata mediante il confronto tra lo spettro ottenuto e quelli reperibili in opportune banche dati.

Lo strumento utilizzato è uno spettrometro Raman System 2000 (Renishaw) interfacciato con un microscopio ottico (Leica) (Figura 9): quest’ultimo consente di effettuare analisi puntuali sul campione, grazie alla possibilità di visualizzare la zona su cui far collimare il raggio laser in uscita dal telaio, in cui è contenuta l’ottica dello spettrometro. Una telecamera, posizionata sul microscopio e collegata al computer, consente di visualizzare il campione ingrandito non solo tramite gli oculari, ma anche sullo schermo. La radiazione diffusa dal campione viene reindirizzata dentro il telaio, in cui viene dispersa da una griglia ottica (1200 l/mm) e rilevata da un rivelatore CCD (Charge Coupled Device), composto da un circuito di elementi semiconduttori che accumula una carica elettrica proporzionale al numero dei fotoni; la componente Rayleigh della diffusione viene rimossa mediante filtro opportuno (filtro Notch).

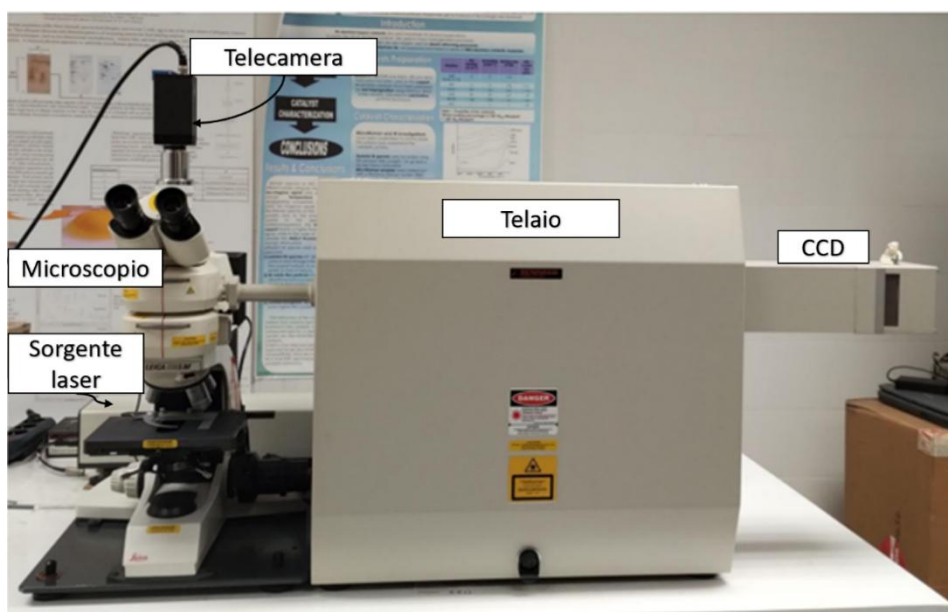


Figura 9. Foto dello spettrometro Raman interfacciato con il microscopio ottico.

Per questo studio, le analisi sono state effettuate utilizzando una sorgente di eccitazione avente lunghezza d'onda pari a 785 nm (diodo laser a stato solido, GaAlAs), con una potenza nominale massima di 500 mW. La taratura dello strumento è eseguita registrando lo spettro Raman del silicio monocristallino, facendo riferimento al modo vibrazionale a 520 cm^{-1} , con una tolleranza di $\pm 1\text{ cm}^{-1}$. Le misure sono state eseguite utilizzando un ingrandimento totale di 500x, considerando il range spettrale di *Raman Shift* compreso tra 4000 cm^{-1} e 100 cm^{-1} , utilizzando la potenza del laser al 50 o al 25%, a seconda della membrana filtrante utilizzata. In presenza di segnali particolarmente intensi, la potenza è stata opportunamente diminuita al 10% o all'1% ed è stata applicata un'eventuale defocalizzazione del fascio, quest'ultimo parametro permette di allontanare il laser dal punto di fuoco diminuendone la densità di potenza. Al fine di migliorare il rapporto segnale/rumore, per alcune particelle è stato necessario raccogliere 4 accumulazioni, ovvero 4 ripetizioni della scansione, che vengono automaticamente sommate tra loro a fine misura.

Gli spettri sperimentali ottenuti dai campioni sono stati confrontati con quelli contenuti in tre diverse banche dati:

- la banca dati dello strumento utilizzato, mediante il programma dello spettrometro RenishawWire, che contiene spettri raccolti mediante l'analisi di materiali standard;
- il database SLoPP Library of Microplastics [109], composto da spettri di campioni reali; questo comporta la presenza di segnali in più rispetto al materiale standard, dovuti a coloranti o altri additivi;
- l'IRUG Spectra Database Index (sezione pigmenti) [110].

Il confronto con gli spettri delle ultime due banche dati è stato eseguito mediante il programma SpeComp [111], un programma realizzato in precedenza dal gruppo di ricerca, in occasione dello studio sui campioni di rene e di urina [1].

3.4.1.1 *SpeComp*

Il software SpeComp permette il confronto tra gli spettri sperimentali e quelli di una banca dati contenente file con estensione *.txt* creata autonomamente. Il confronto avviene attraverso l'applicazione di diversi possibili modelli matematici: l'*Hit Quality Index* (HQI), la Correlazione Normalizzata, la Convoluzione, Convoluzione a Trasformata di Fourier Veloce, Correlazione Discreta, Metrica di Differenza. Tutti questi modelli restituiscono un indice standard relativo che indica la validità del risultato ottenuto. Per questo lavoro sono stati utilizzati i primi due modelli, consigliati, in quanto veloci e robusti, per un confronto generale con una banca dati sufficientemente ridotta. L'HQI (Equazione 2) valuta la corrispondenza di

due spettri prendendo in considerazione le posizioni dei loro segnali e le loro intensità normalizzate; quantifica quindi la somiglianza tra due spettri con un valore compreso tra 0 e 1, dove 1 rappresenta l'identità, data da posizioni, intensità e forma dei segnali.

$$HQI = \frac{[\sum_{i=1}^n s_1(\tilde{\nu}_i)s_2(\tilde{\nu}_i)]^2}{[\sum_{i=1}^n s_1(\tilde{\nu}_i)^2][\sum_{i=1}^n s_2(\tilde{\nu}_i)^2]}$$

Equazione 2. Definizione matematica dell'Hit Quality Index. ($s_1(\tilde{\nu}_i)$ e $s_2(\tilde{\nu}_i)$)= valori di intensità al *Raman Shift* ($\tilde{\nu}_i$); n= numero di segnali)

L'HQI, sebbene sia normalmente utilizzato per il confronto degli spettri Raman, è sensibile a rumore e distorsioni; per questo motivo è stato simultaneamente utilizzato anche il modello della Correlazione Normalizzata (Equazione 3), che tiene conto della somiglianza complessiva tra gli spettri, considerando la presenza di rumore e di eventuali distorsioni dovuti a fluorescenza o altri fattori. Il valore assoluto della Correlazione Normalizzata ($|r|$) è anch'esso compreso tra 0 a 1 e, come nel caso del precedente algoritmo, quantifica la correlazione tra i due spettri.

$$r = \frac{\sum_{i=1}^n (s_1(\tilde{\nu}_i) - \bar{s}_1)(s_2(\tilde{\nu}_i) - \bar{s}_2)}{\sqrt{\sum_{i=1}^n (s_1(\tilde{\nu}_i) - \bar{s}_1)^2} \sqrt{\sum_{i=1}^n (s_2(\tilde{\nu}_i) - \bar{s}_2)^2}}$$

Equazione 3. Definizione matematica della Correlazione Normalizzata. ($s_1(\tilde{\nu}_i)$ e $s_2(\tilde{\nu}_i)$)= valori di intensità al *Raman Shift* ($\tilde{\nu}_i$); \bar{s}_1 e \bar{s}_2 = valori medi dell'intensità per ogni spettro; n= numero di segnali)

Il programma esegue la normalizzazione a priori su tutti gli spettri attraverso due possibili *routine* di normalizzazione: la Normalizzazione MinMax, che permette di scalare tutti i valori d'intensità nell'intervallo [0, 1], e la Normalizzazione statistica (Z-score), che standardizza tutti i dati in modo che abbiano media uguale a 0 e deviazione standard pari a 1. Durante questo lavoro è stata utilizzata la Normalizzazione MinMax in quanto indicata per confrontare gli spettri indipendentemente dall'intensità assoluta.

$$s_{norm}(\tilde{\nu}_i) = \frac{s(\tilde{\nu}_i) - \min(s)}{\max(s) - \min(s)}$$

Equazione 4. Definizione matematica della Normalizzazione MinMax. ($s_{norm}(\tilde{\nu}_i)$)= intensità normalizzata del segnale a $\tilde{\nu}_i$; $s(\tilde{\nu}_i)$ = intensità del segnale a $\tilde{\nu}_i$; $\min(s)$ = intensità minima nello spettro; $\max(s)$ = intensità massima nello spettro)

Attraverso l'impiego di un filtro gaussiano è possibile ridurre il rumore spettrale, mentre l'eventuale fluorescenza si può rimuovere attraverso l'utilizzo di un filtro basato su una funzione Savitzky-Golay. Nel caso di impiego di membrane filtranti o supporti caratterizzati da intensi segnali Raman, previa registrazione del loro spettro, durante la fase di confronto è

stato possibile sottrarre il loro contributo dallo spettro di lavoro in modo da ottenere degli spettri contenenti solo i segnali di interesse.

Per lo studio è stato adottato un valore soglia di HQI e r pari o maggiore a 0.5 per identificare spettri con un livello di somiglianza significativo rispetto agli spettri di riferimento, escludendo confronti caratterizzati da una bassa correlazione spettrale.

3.4.2 *Dynamic Light Scattering-Laser Doppler Electrophoresis*

Per le analisi di *Dynamic Light Scattering* (DLS) e *Laser Doppler Electrophoresis* (LDE) è stato impiegato lo strumento Zetasizer Nano ZS (Malvern Instruments) (Figura 10).



Figura 10. Foto dello Zetasizer Nano ZS (Malvern Instruments).

Attraverso la tecnica DLS lo strumento è capace di stabilire il diametro idrodinamico delle particelle mediante la correlazione con il loro moto Browniano. Il diametro idrodinamico ottenuto è il diametro di una sfera ideale che si muove con la stessa velocità delle particelle del campione. Il moto Browniano è definito come il movimento casuale delle particelle in un liquido dovuto all'urto delle molecole che le circondano ed è correlato alla temperatura, alla viscosità del mezzo e alla dimensione delle particelle così come descritto dall'equazione di Stokes-Einstein (Equazione 5).

$$D = \frac{k_B T}{3\pi\eta d_p}$$

Equazione 5. Equazione di Stokes-Einstein (D = coefficiente di diffusione delle particelle, d_p = diametro idrodinamico, k_B = costante di Boltzmann, T = temperatura, η = viscosità del mezzo di dispersione).

Il sistema Zetasizer impiega una radiazione monocromatica generata da una sorgente laser elio-neon (He-Ne) con una lunghezza d'onda pari a 633nm. Il fascio laser viene convogliato sul campione, interagendo direttamente con le particelle in sospensione. Le particelle diffondono la radiazione incidente in tutte le direzioni e tale luce diffusa viene raccolta da un rivelatore, posizionato a un angolo fisso di 90° rispetto al campione. Il rivelatore registra un profilo a macchie, che fluttua nel tempo a causa del moto delle particelle. Lo strumento monitora questa fluttuazione temporale dell'intensità del segnale luminoso e la elabora tramite un correlatore digitale. Questo componente misura matematicamente il grado di somiglianza del segnale a diversi intervalli temporali generando una funzione di correlazione caratterizzata da un profilo di decadimento:

- Particelle piccole: cambiano posizione velocemente, determinando fluttuazioni brusche; la funzione di correlazione decade rapidamente.
- Particelle grandi: si muovono più lentamente, perciò le fluttuazioni del segnale risultano più blande; il decadimento della correlazione è più graduale.

Dalla curva di correlazione lo strumento ricava il coefficiente di diffusione D e calcola il diametro idrodinamico della popolazione di particelle, fornendo anche l'indice di polidispersione (PDI), un parametro adimensionale che quantifica l'ampiezza della distribuzione dimensionale delle particelle con un valore da 1 a 0. Per sistemi caratterizzati da un'elevata eterogeneità granulometrica il valore del PDI risulta maggiore rispetto a sistemi monodispersi, evidenziando la natura polidispersa del campione.

Le misure di LDE si basano sullo sviluppo di una carica netta superficiale sulle particelle in esame e dalla sua influenza sulla distribuzione degli ioni nella regione di interfaccia circostante. Questo fenomeno determina un aumento della concentrazione di contro-ioni (di carica opposta a quella della particella) in prossimità della superficie. Questa organizzazione ionica dà origine al doppio strato elettrico, caratterizzato da due regioni principali:

- Strato di Stern: la porzione più interna, in cui gli ioni sono fortemente legati alla superficie particellare.
- Strato diffuso: la zona esterna, in cui gli ioni sono attratti debolmente dalla particella e risultano più mobili.

All'interno dello strato diffuso esiste un confine ideale entro il quale la particella e gli ioni si muovono come un'entità stabile, tale confine è detto piano di scivolamento (*slipping plane*). Il potenziale elettrico misurato in corrispondenza di questo piano è definito potenziale Zeta. Tale valore rappresenta la grandezza fondamentale per valutare la stabilità delle sospensioni, poiché riflette l'entità delle repulsioni elettrostatiche che impediscono l'aggregazione delle particelle. Queste vengono considerate stabili quando il loro potenziale Zeta è maggiore di +30 mV e minore di -30 mV.

La misura avviene mediante l'applicazione di un campo elettrico, il quale induce il movimento delle particelle cariche sospese nel campione verso l'elettrodo di carica opposta. La velocità di una particella in un campo elettrico viene definita mobilità elettroforetica e viene misurata dallo strumento mediante la rilevazione della radiazione diffusa dal campione da parte di un rivelatore posto a 13° rispetto al campione. La radiazione incidente è la medesima della tecnica DLS e il rivelatore registra le fluttuazioni del segnale proporzionali alla velocità. La mobilità elettroforetica è correlata con il potenziale Zeta attraverso l'applicazione dell'equazione di Henry (Equazione 6).

$$U_e = \frac{2\varepsilon z f(k_a)}{3\eta}$$

Equazione 6. Equazione di Henry (U_e = mobilità elettroforetica, ε = costante dielettrica, z = potenziale Zeta, η = viscosità del mezzo di dispersione, $f(k_a)$ = funzione di Henry (il valore è pari a 1.5 per l'applicazione del modello Smoluchowski utilizzato per le soluzioni acquose).

Ogni misura riportata rappresenta il valore medio di tre acquisizioni indipendenti, ciascuna articolata in un numero specifico di cicli (*run*) e un tempo di acquisizione. Per le analisi DLS, i cicli e i tempi sono stati ottimizzati per massimizzare la qualità del segnale. Nello specifico:

- Per le sospensioni di polietilene (PE), sono impostati 20 *run* da 12 secondi ciascuno.
- Per le microsfere di polistirene (PS), a seguito di una fase preliminare condotta con le medesime impostazioni utilizzate per il polietilene, si è ritenuto opportuno ottimizzare il protocollo sperimentale.

Per quanto riguarda le analisi LDE ogni acquisizione è stata composta da 25 *run*. In questo caso il tempo di acquisizione non è stato modificato manualmente, essendo gestito dal software in funzione della conducibilità del campione e della stabilità del campo elettrico.

I parametri sperimentali impostati per le analisi condotte a temperatura standard di 25°C sono riassunti in Tabella 4 e in Tabella 5. Si specifica che, per le prove effettuate in funzione

della temperatura, il *software* ha provveduto alla compensazione automatica della viscosità (η) e dell'indice di rifrazione (n) del mezzo disperdente, necessari per il corretto calcolo dei parametri misurati.

Tabella 4. Parametri per l'analisi del diametro idrodinamico inseriti per i campioni di MP in H₂O.

Materiale	Polietilene	Polistirene
Indice di Rifrazione del materiale	1.51	1.59
Assorbanza del materiale	0.000	0.010
Mezzo di dispersione	H ₂ O	H ₂ O
Indice di rifrazione del mezzo di dispersione	1.330	1.330
Viscosità (cP)	0.8872	0.8872
Temperatura (°C)	25.0	25.0
Cella utilizzata	DTS0012	DTS0012

Tabella 5. Parametri per analisi di potenziale Zeta inseriti per i campioni di MP in H₂O

Mezzo di dispersione	H ₂ O
Indice di rifrazione del mezzo di dispersione	1.330
Viscosità (cP)	0.8872
Costante dielettrica del mezzo	78.5
Temperatura (°C)	25.0
Descrizione della cella	DTS1060

3.4.3 *Microscopia elettronica a scansione (SEM)*

La microscopia elettronica a scansione (SEM) è una tecnica d'indagine che permette di ottenere immagini di un campione ad alta risoluzione, raggiungendo scale dimensionali dell'ordine dei nanometri (10^{-9} m). Il principio di funzionamento si basa sull'interazione tra un fascio di elettroni primari e la superficie del campione. La sorgente rilascia elettroni per effetto termoionico e il fascio generato viene accelerato e focalizzato sul campione. Nei materiali isolanti la conducibilità elettrica è pressoché nulla, di conseguenza gli elettroni del fascio rimangono intrappolati sulla superficie del materiale comportando alcuni artefatti:

deflessione del fascio primario, saturazione del contrasto e danneggiamento termico. Per evitare questi fenomeni, i materiali isolanti, come le plastiche, vengono sottoposti a un processo di rivestimento con metalli, in modo da dissipare la carica. L'interazione fascio primario-campione genera diverse tipologie di segnali: ai fini del presente studio ci soffermeremo sul fenomeno di emissione di elettroni secondari (SE) ed elettroni *backscattered* o retro-diffusi (BSE), raccolti rispettivamente mediante i rivelatori di elettroni dedicati, SED (*Secondary Electron Detector*) e BSD (*Backscattered electron Detector*).

Gli elettroni secondari sono caratterizzati da una bassa energia, provengono dagli strati più superficiali del campione e forniscono informazioni dettagliate sulla sua morfologia. Gli elettroni retro-diffusi provengono da uno strato più profondo, il segnale dipende fortemente dal numero atomico degli elementi presenti e permette di ottenere un contrasto composizionale.

Le analisi, effettuate presso la sede distaccata del CNR-ICMATE ospitata nel Dipartimento di Ingegneria Civile, Chimica e Ambientale (DICCA) dell'Università di Genova, sono state eseguite sui medesimi materiali standard impiegati per le analisi DLS ed LDE: le microparticelle di polietilene (PE) e le microsferiche di (PS). Le analisi sono state eseguite mediante un Phenom ProX, impiegando la sorgente di elettroni CeB₆. La procedura ha previsto la deposizione sul portacampioni (*stub*) previa dispersione in soluzioni acquose:

- Microplastiche di PE: sono state disperse in acqua deionizzata (H₂O).
- Microparticelle di PS: oltre all'analisi diretta della soluzione madre, sono state preparate sospensioni nei mezzi disperdenti utilizzati per le analisi DLS-LDE, nello specifico H₂O, KOH e HNO₃.

I campioni sono stati rivestiti con uno strato sottile in oro (Au), depositato mediante *sputtering*, e analizzati impostando un voltaggio pari a 15 kV per modulare l'accelerazione del fascio elettronico. Per ogni campione sono state raccolte le immagini ottenute a differenti ingrandimenti.

4 RISULTATI E DISCUSSIONE

In questo capitolo vengono presentati e discussi i risultati ottenuti dalla caratterizzazione chimico-fisica dei campioni, mediante le due tecniche di analisi impiegate.

Gli spettri Raman riportati sono stati elaborati attraverso la correzione della linea di base, sia per minimizzare il contributo della fluorescenza, quando presente, sia per azzerare quest'ultima per tutti gli spettri, in funzione della massimizzazione del rapporto segnale/rumore. Successivamente, gli spettri sono stati ulteriormente normalizzati rispetto al segnale più intenso per ottimizzare il confronto diretto tra i diversi segnali e facilitare il confronto tra spettri diversi. Nei grafici in cui vengono riportati due o più spettri, al fine di agevolarne il confronto visivo, è stato applicato un *offset* lungo l'asse delle ordinate. Tale operazione consente di distanziare i profili spettroscopici, limitando la sovrapposizione dei segnali.

4.1 Caratterizzazione dei campioni reali

4.1.1 Selezione della membrana filtrante e del supporto

L'analisi preliminare svolta sulle membrane filtranti e sui supporti inorganici è stata condotta per selezionare le migliori condizioni di misura da impiegare, successivamente, per la ricerca di microplastiche nei campioni reali. La composizione dei filtri e la dimensione dei pori hanno, infatti, una forte influenza sull'analisi strumentale e sulla possibilità di analizzare fattivamente dei campioni.

Per i campioni di fluidi da dialisi, sono state condotte analisi preliminari su membrane in PTFE, PES e PVDF con pori da 0.2 μm . L'ispezione visiva è stata effettuata al microscopio ottico del Raman su tre filtri per ogni tipologia di filtro impiegato: con questa analisi è stato possibile escludere la presenza di frammenti già presenti sui filtri prima del loro utilizzo, quindi imputabili al processo di produzione o confezionamento. Successivamente, si è proceduto con la registrazione degli spettri Raman dei diversi filtri, riportati di seguito (rispettivamente PTFE, PES e PVDF in Figura 11, Figura 12 e Figura 13).

Per questi spettri, non è stata effettuata la correzione della linea di base per evidenziare lo spettro tal quale e di conseguenza enfatizzare i limiti sperimentali riconducibili all'utilizzo di ciascun supporto.

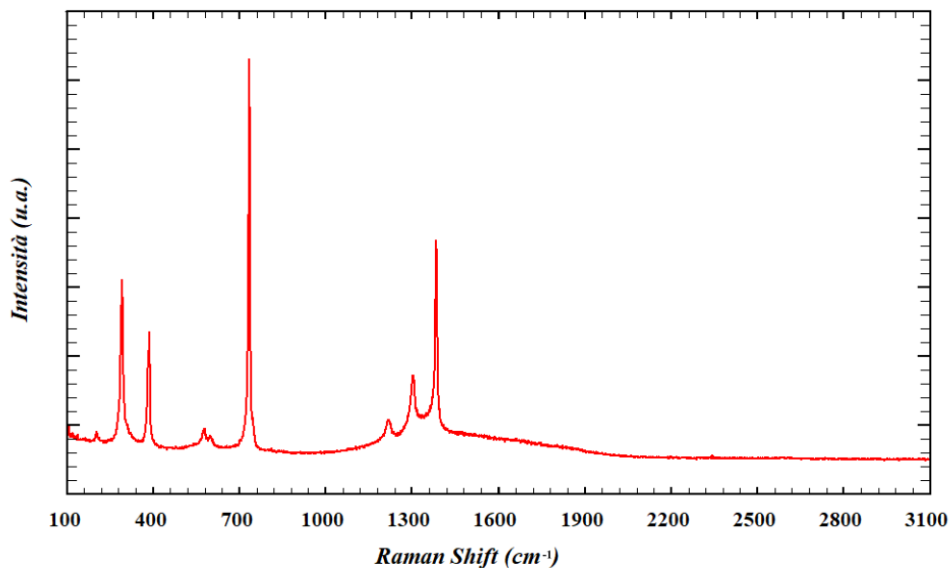


Figura 11. Spettro Raman della membrana in PTFE.

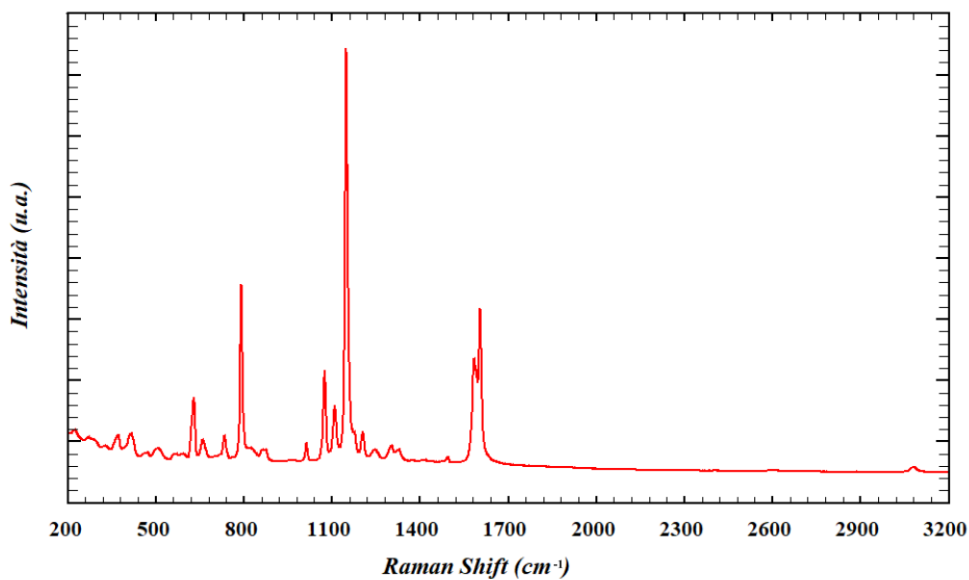


Figura 12. Spettro Raman della membrana in PES.

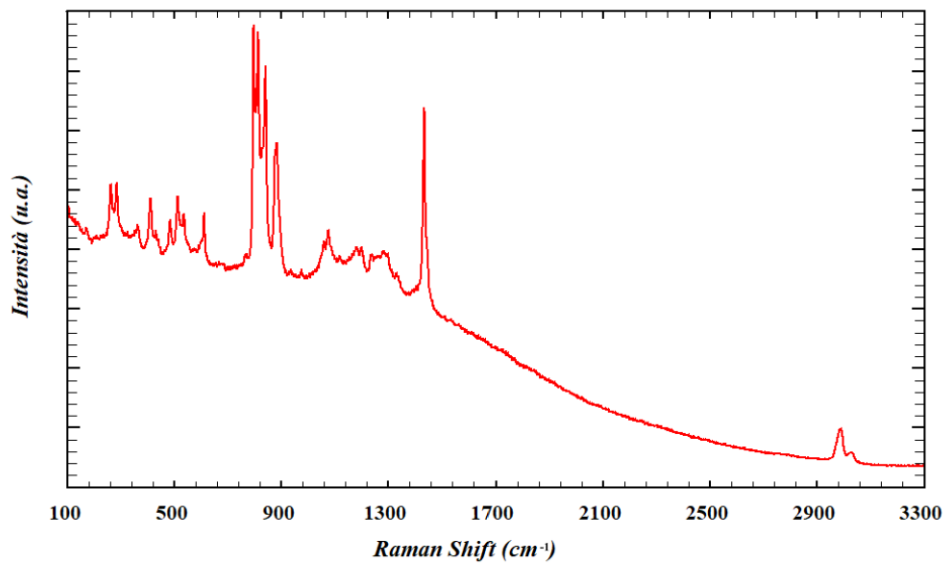


Figura 13. Spettro Raman della membrana in PVDF.

L'indagine preliminare svolta sui filtri ha orientato la scelta verso i supporti in PTFE e PES, portando a escludere il PVDF. Quest'ultimo, infatti, ha mostrato una marcata fluorescenza nella zona di *Raman Shift* a bassi numeri d'onda, che avrebbe potuto mascherare i segnali delle particelle nei campioni. Al contrario, PTFE e PES hanno permesso l'ottimizzazione dei parametri sperimentali: il PTFE ha dimostrato una buona tolleranza della potenza massima del laser (100%, corrispondente a circa 292 mW), mentre per il PES è stato opportuno ridurla al 25%, al fine di prevenire fenomeni di degrado termico della membrana.

Per la preparazione dei campioni di EBC sono stati testati un substrato in silicio monocristallino e un supporto in allumina. L'indagine visiva preliminare ha evidenziato la presenza di una patina sulla superficie del silicio oltre ad alcune particelle non identificate tramite confronto con altri spettri presenti nelle banche dati: per la loro rimozione, è stato necessario effettuare un pretrattamento con acido nitrico al 65%. Una successiva verifica al microscopio ha confermato l'efficacia del trattamento, mostrando una superficie priva di contaminanti, come nel caso dell'allumina. Prima di procedere con la deposizione di uno standard di microplastiche di PE sulle due superfici, sono stati acquisiti gli spettri Raman dei substrati, come riferimento, al fine di individuare i parametri sperimentali ottimali (Figura 14, Figura 15; analogamente alle Figure 11-13, anche in questo caso negli spettri non è stata eseguita una correzione della linea di base).

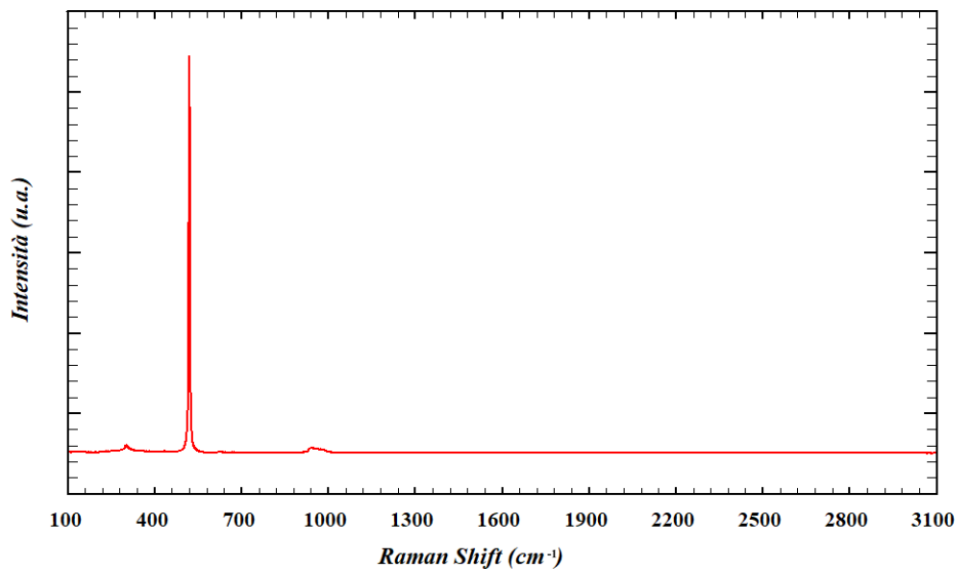


Figura 14. Spettro Raman della membrana in silicio monocristallino.

L'acquisizione dello spettro sul substrato di silicio ha richiesto una drastica riduzione della potenza del laser all'1% e una defocalizzazione del fascio fino al 90%, a causa dell'intenso segnale caratteristico del materiale a 520 cm^{-1} . Nonostante tali accorgimenti, a seguito della dispersione delle microplastiche commerciali sulla superficie del silicio, non è stato possibile registrarne lo spettro: i segnali del polimero erano infatti mascherati dall'intenso segnale di fondo dato dal supporto.

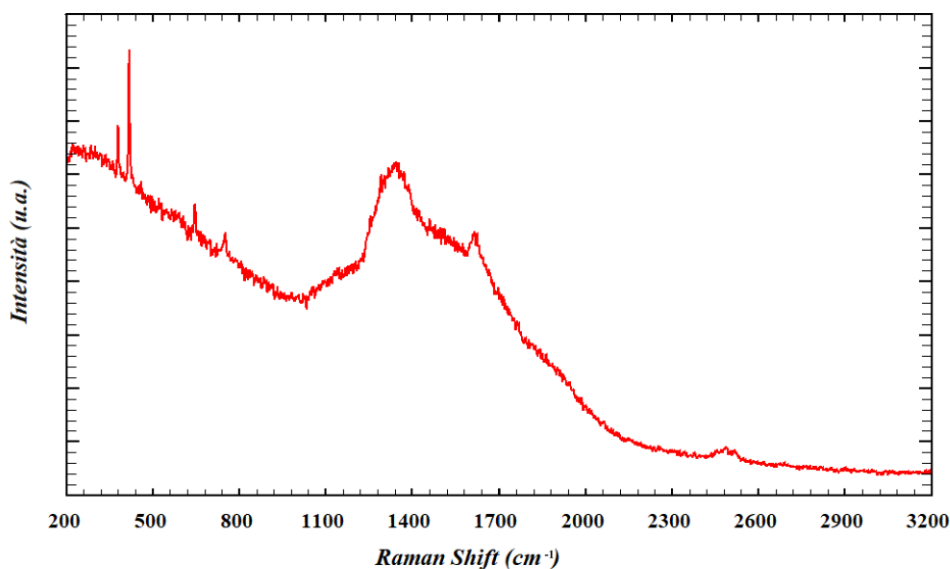


Figura 15. Spettro Raman del supporto in allumina.

La misura condotta sul supporto in allumina ha consentito l'impiego della potenza massima del laser (100%). Sebbene lo spettro mostrasse un innalzamento del fondo verso *Raman Shift* minori e un segnale bidentato tra i 1300 e i 1800 cm^{-1} , l'acquisizione dello spettro delle microplastiche commerciali depositate sulla superficie del supporto è risultata possibile. La bassa intensità dei segnali del substrato ha infatti permesso di visualizzare i modi vibrazionali caratteristici del polimero (Figura 16). L'insieme di queste evidenze sperimentali ha decretato la scelta del supporto in allumina come substrato ottimale per le analisi sui campioni reali di esalato condensato.

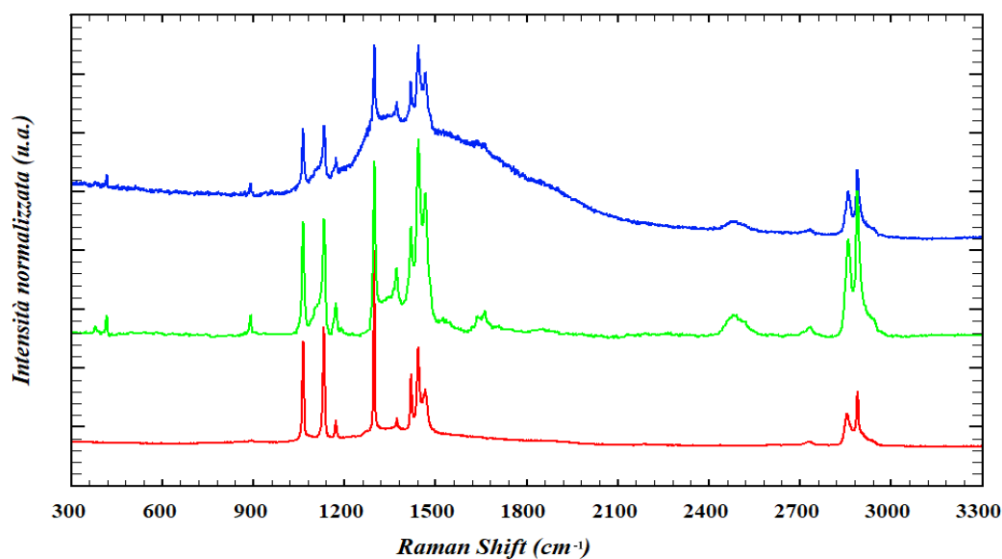


Figura 16. Confronto tra lo spettro sperimentale delle MP di PE senza supporto in allumina (rosso), su supporto in allumina senza correzione della fluorescenza (blu) e con correzione della fluorescenza (verde).

4.1.2 Analisi dei fluidi di dialisi

Come già descritto nel paragrafo 3.1.2 i campioni dei fluidi di dialisi da 600 mL e quelli da 2 L sono stati preparati in momenti e luoghi differenti; tale discrepanza ha richiesto l'analisi di campioni dell'H₂O deionizzata utilizzata nei due laboratori.

Nell'acqua impiegata per preparare i campioni da 600 mL è stata riscontrata una contaminazione da fibre, rinvenute anche nei fluidi da dialisi (Figura 17). Si è proceduto quindi alla raccolta delle fibre e alla loro caratterizzazione: la comparazione tra gli spettri Raman raccolti su tali fibre e gli spettri del *database* SLoPP [109] ha evidenziato una somiglianza con il profilo spettrale dell'acetato di cellulosa, in particolare tra i segnali a 1100 cm⁻¹ e 1120 cm⁻¹. È stato quindi effettuato un ulteriore confronto con lo spettro Raman di un film di cellulosa pura, a disposizione nel laboratorio del D.C.C.I., che ne ha confermato la natura (Figura 18). La loro origine è plausibilmente riconducibile alla deposizione di fibre aerodisperse presenti nell'ambiente ove si è effettuata la preparazione dei campioni senza l'utilizzo della cappa a flusso laminare.

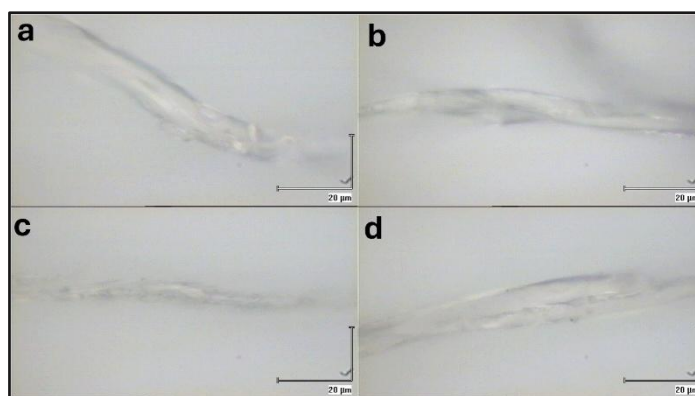


Figura 17. Alcune delle fibre di cellulosa individuate in un campione d'acqua (a), in un campione di Extraneal (b), in un campione di glucosio all'1.36% (c) e al 2.27% (d).

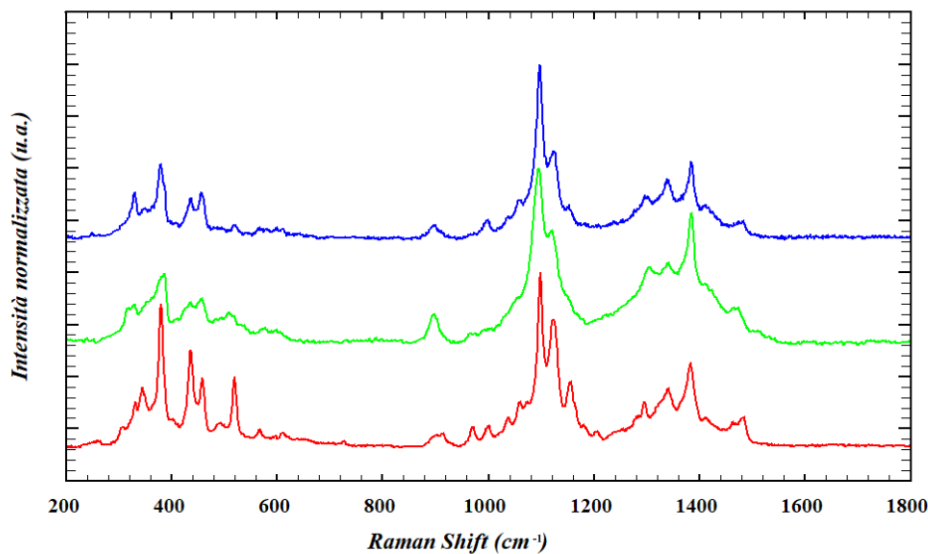


Figura 18. Confronto tra lo spettro Raman sperimentale del film di cellulosa di riferimento (rosso), di una fibra individuata in un campione d'acqua (verde) e in un campione di glucosio (blu).

Sono stati successivamente analizzati i campioni d'acqua associati ai campioni da 2 L. Nell'acqua deionizzata non filtrata è stata riscontrata una contaminazione da particelle sferiche (Figura 19); tuttavia, non è stato possibile identificarne la composizione a causa dell'assenza di corrispondenze all'interno delle librerie spettrali disponibili. Al contrario, l'analisi condotta sulla medesima acqua sottoposta a filtrazione, non ha rilevato la presenza di alcuna particella contaminante, validando l'efficacia del trattamento dell'H₂O prima del suo utilizzo per la preparazione dei campioni di fluido da dialisi.

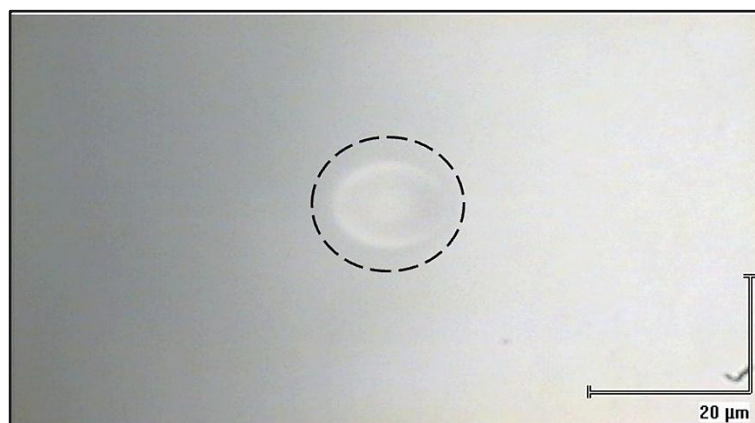


Figura 19. Immagine ottenuta mediante microscopia ottica di una delle particelle sferiche individuate nel campione di acqua non filtrata.

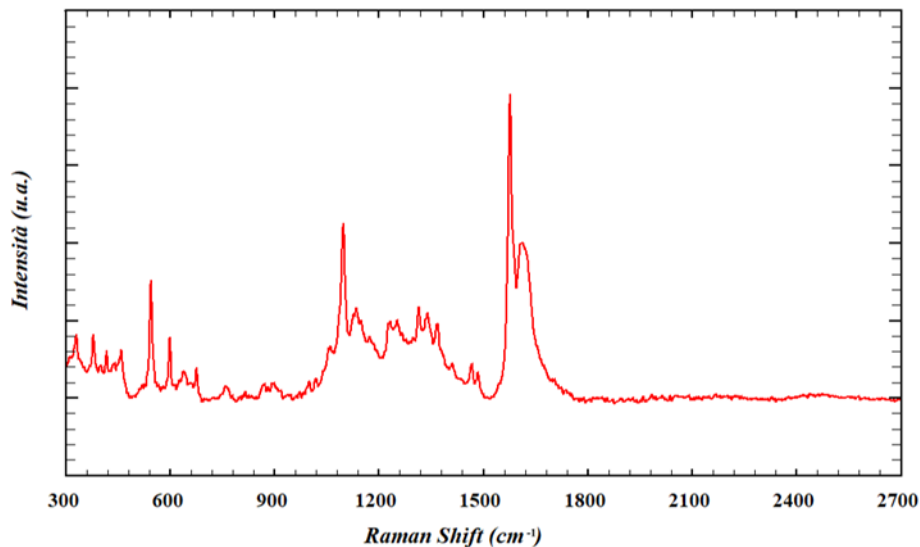


Figura 20. Spettro Raman di una delle particelle sferiche presenti nei bianchi di acqua non filtrata.

Inoltre, come precedentemente riportato, sono stati acquisiti gli spettri Raman delle soluzioni di glucosio e di Extraneal (Figura 21 e Figura 22), concentrandosi sui residui osservabili dopo aver lasciato le soluzioni ad asciugare all'aria. In questo modo è stato possibile disporre di profili spettrali di riferimento, utili per effettuare il confronto in presenza dei campioni reali e di conseguenza escludere eventuali segnali riconducibili ai residui zuccherini presenti nei campioni.

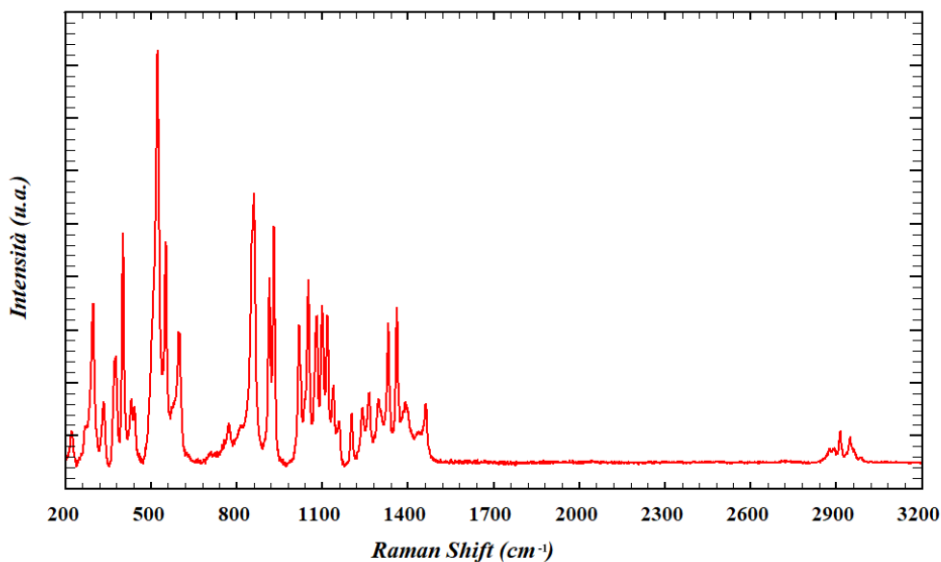


Figura 21. Spettro Raman acquisito sui residui cristallini della soluzione di glucosio al 3.86%

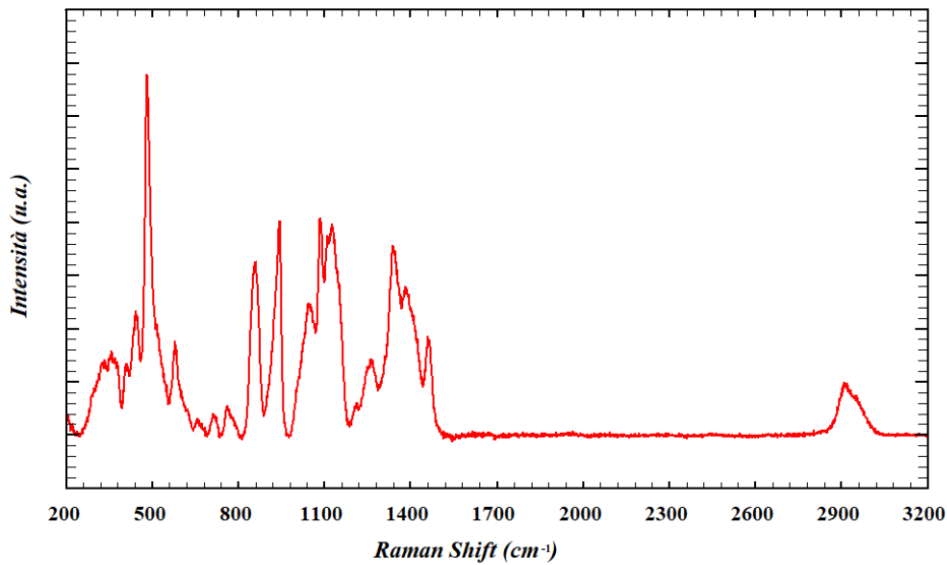


Figura 22. Spettro Raman acquisito sui residui cristallini della soluzione di icodestrina (Extraneal).

Il confronto tra gli spettri ottenuti dai materiali impiegati nel *packaging* delle soluzioni da dialisi con quelli di riferimento presenti nella banca dati [109], ha permesso di identificare come polipropilene il materiale delle sacche contenenti glucosio (Figura 23) e come polivinilcloruro il polimero costituente le sacche di Extraneal (Figura 24).

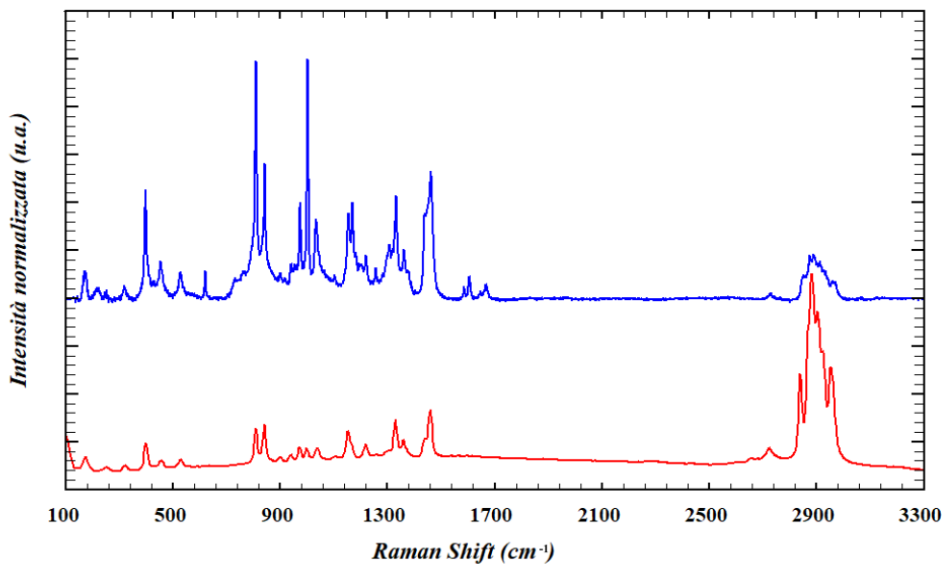


Figura 23. Confronto tra il materiale del *packaging* delle soluzioni di glucosio (blu) e del polipropilene del *database* (rosso) [109].

Sebbene si osservino alcune discrepanze tra spettro sperimentale e quello del *database* [109], è fondamentale considerare che in entrambi i casi si tratta di campioni reali. Di conseguenza, tali deviazioni possono essere attribuite alla presenza di additivi impiegati nella produzione dei due polimeri.

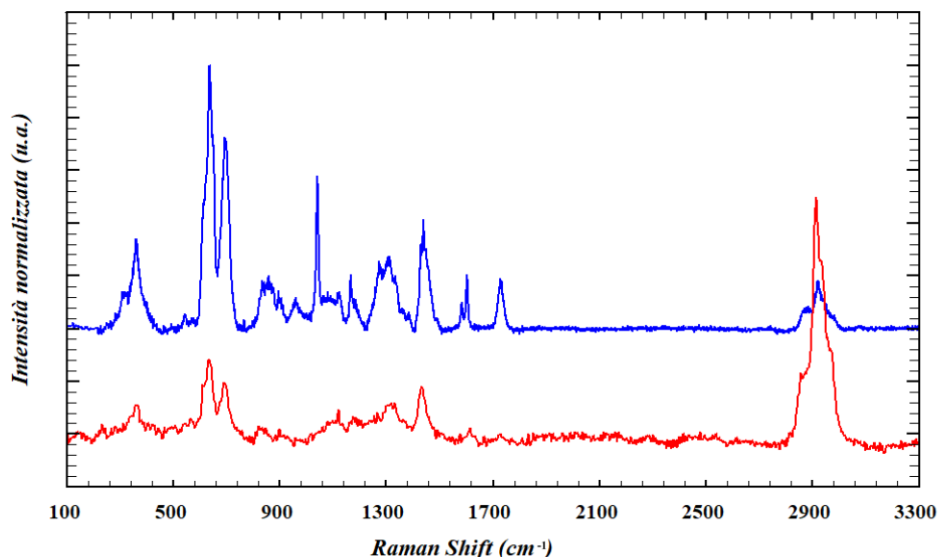


Figura 24. Spettro raccolto del *packaging* della soluzione di Extraneal (blu) e del polivinilcloruro del *database* (rosso) [109].

Anche in questo caso, nello spettro sperimentale, si osservano dei segnali aggiuntivi rispetto al polimero di riferimento. Questi segnali sono imputabili alla presenza di additivi che, trattandosi di materiali di grado medico, devono garantire proprietà quali flessibilità, biocompatibilità e resistenza alla sterilizzazione termica, impedendo il rilascio di sostanze tossiche nel fluido dialitico. A tal proposito, è possibile ipotizzare la presenza di agenti plastificanti (fondamentali per garantire la flessibilità della sacca), stabilizzanti termici e antiossidanti (introdotti per prevenire la degradazione del materiale durante i processi di sterilizzazione industriale). Nello specifico, nello spettro in Figura 24 si possono notare i segnali corrispondenti agli ftalati, ricorrenti come plastificanti nella manifattura di PVC per uso sanitario [112], ai *Raman Shift*: $\sim 1730\text{ cm}^{-1}$, $\sim 1600\text{ cm}^{-1}$, $\sim 1580\text{ cm}^{-1}$ e $\sim 1040\text{ cm}^{-1}$ [113]. Nello spettro in Figura 23 sono presenti i segnali attribuibili all'impiego di altri tipi di additivi utilizzati più frequentemente nel PP, come antiossidanti fenolici [114].

Complessivamente sono stati analizzati 16 campioni di fluidi di dialisi, identificati secondo una nomenclatura specifica basata sul volume analizzato e sulla composizione chimica della soluzione:

- 600_xGL% e 600_xEX: Indicano i campioni con volume pari a 600mL.
- 2_xGL% e 2_xEX: Indicano i campioni con volume pari a 2 L.

All'interno di tali sigle, la lettera x (1 o 2) esprime il numero del campione a parità di composizione; le abbreviazioni GL ed EX si riferiscono rispettivamente alle soluzioni di glucosio e di Extraneal; infine, il pedice % specifica la concentrazione della soluzione di glucosio (1 = 1.36%, 2 = 2.27%, 3 = 3.86%, 4 = 4.25%). Le singole microparticelle individuate all'interno di ciascun campione sono state a loro volta indicate aggiungendo un numero progressivo (z) alla sigla (ad esempio, la dicitura 2_1EX_z indica la z-esima particella analizzata nel campione di Extraneal numero 1 da 2 L).

Le fibre, precedentemente individuate come contaminanti nell'acqua deionizzata, nei campioni 600_xGL% e 600_xEX sono state alla fine escluse dall'analisi, in quanto ubiquitarie in quelli non processati sotto cappa a flusso laminare (in ogni campione è stato rilevato un numero di fibre compreso tra 5 e 10). Dal punto di vista morfologico, la totalità delle microplastiche rinvenute sono risultate prive di colorazione e caratterizzate da una spiccata eterogeneità dimensionale (Figura 25, Figura 28 e Figura 31). I risultati ottenuti sono riassunti in Tabella 6.

Tabella 1. Particelle identificate nei campioni di fluidi di dialisi (sono state escluse dalla tabella le fibre e i residui di glucosio e icodestrina).

Campione	Particella	Materiale	Dimensione (µm)	Campione	Particella	Materiale	Dimensione (µm)	
600_1GL ₁	600_1GL _{1_5}	PE	~6	2_1GL ₃	2_1GL _{3_1}	PE	~10	
	600_1GL _{1_6}	PE	~4		2_1GL _{3_2}	PE	~16	
600_1GL ₂	600_1GL _{2_4}	PE	~10		2_1GL _{3_7}	PE	~6	
600_2GL ₃	600_2GL _{3_8}	PE	~10		2_1GL _{3_8}	PE	~3	
	600_2GL _{3_10}	PE	~9		2_1GL _{3_10}	PP	~15	
600_1EX	600_1EX ₁₄	PP	~19		2_1GL _{3_12}	PE	~10	
2_1GL ₁	2_1GL _{1_11}	PE	~3		2_1GL _{3_13}	PE	~11	
	2_1GL _{1_15}	PE	~10		2_1GL _{3_15}	PE	~25	
	2_1GL _{1_16}	PE	~4		2_1GL _{3_16}	PE	~6	
	2_1GL _{1_17}	PE	~8		2_1GL _{3_17}	PE	~8	
2_2GL ₁	2_2GL _{1_1}	PE	~15		2_1GL _{3_18}	PE	~9	
	2_2GL _{1_5}	PP	~120		2_1GL _{3_19}	PE	~19	
	2_2GL _{1_6}	PE	~21		2_1GL ₄	2_1GL _{4_1}	PE	~3
	2_2GL _{1_7}	PE	~35			2_1GL _{4_4}	PE	~12
2_1GL ₂	2_1GL _{2_1}	PE	~6			2_1GL _{4_5}	PE	~2
	2_1GL _{2_2}	PE	~3			2_1GL _{4_7}	PE	~6
	2_1GL _{2_4}	PE	~9			2_1GL _{4_8}	PE	~1
2_2GL ₂	2_2GL _{2_1}	PE	~17			2_1GL _{4_9}	PE	~5
	2_2GL _{2_2}	PE	~6			2_1GL _{4_10}	PE	~18
	2_2GL _{2_3}	PP	~4	2_1GL _{4_12}		PE	~7	
	2_2GL _{2_4}	PP	~40	2_1GL _{4_13}		PP	~2	
	2_2GL _{2_5}	PP	~15	2_1GL _{4_14}		PE	~6	
	2_2GL _{2_6}	PP	~14	2_1GL _{4_15}		PE	~6	
	2_2GL _{2_7}	PP	~15	2_1GL _{4_16}		PE	~4	
	2_2GL _{2_8}	PE	~9	2_1GL _{4_17}		PE	~2	
	2_2GL _{2_9}	PP	~20	2_1EX		2_1EX_2	PE	~11
	2_2GL _{2_11}	PP	~18			2_1EX_5	PE	~10
	2_2GL _{2_12}	PE	~3			2_1EX_6	PE	~9
	2_2GL _{2_14}	PP	~11	2_2EX	2_2EX_1	PP	~18	
	2_2GL _{2_15}	PP	~44		2_2EX_2	PP	~22	
	2_2GL _{2_16}	PP	~50					

Nei campioni 600_2GL₁, 600_1GL₃, 600_2EX e 2_2GL₄ non sono stati identificati frammenti di plastica.

Di seguito vengono riportate le immagini delle particelle identificate e i relativi spettri.

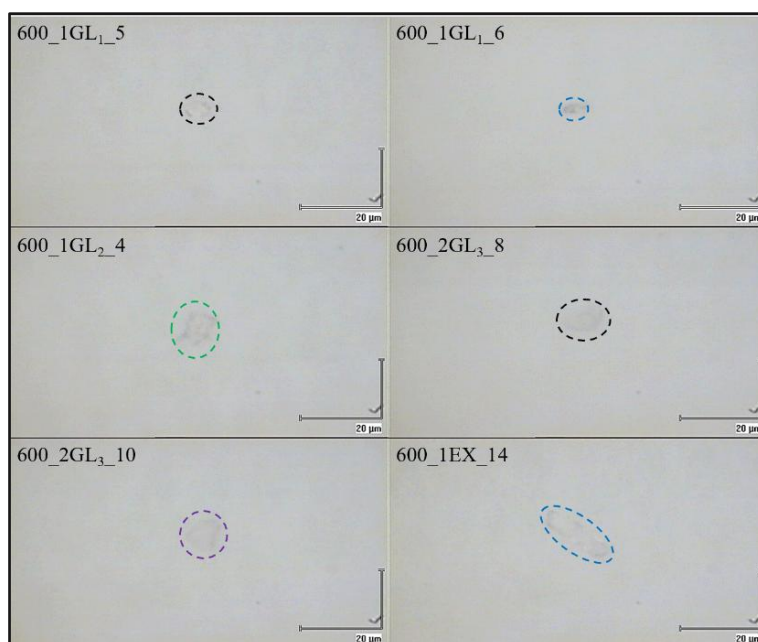
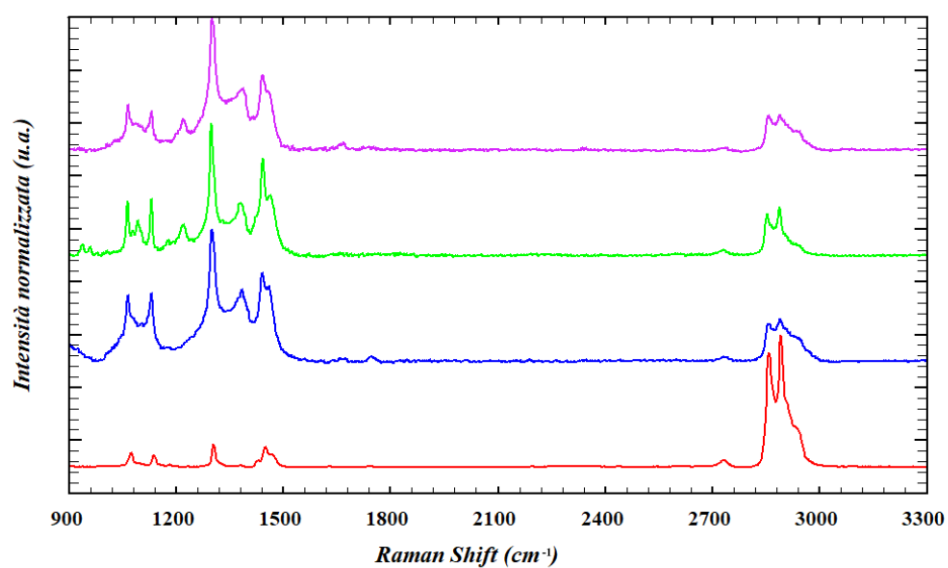


Figura 25. Particelle individuate nei campioni da 600 mL. Le particelle di cui viene riportato lo spettro Raman sono evidenziate utilizzando il colore che richiama il relativo spettro.

Figura 26. Confronto tra lo spettro delle particelle 600_1GL₁_6 (blu), 600_1GL₂_4 (verde), 600_2GL₃_10 (viola) e il polietilene del *database* (rosso) [109].



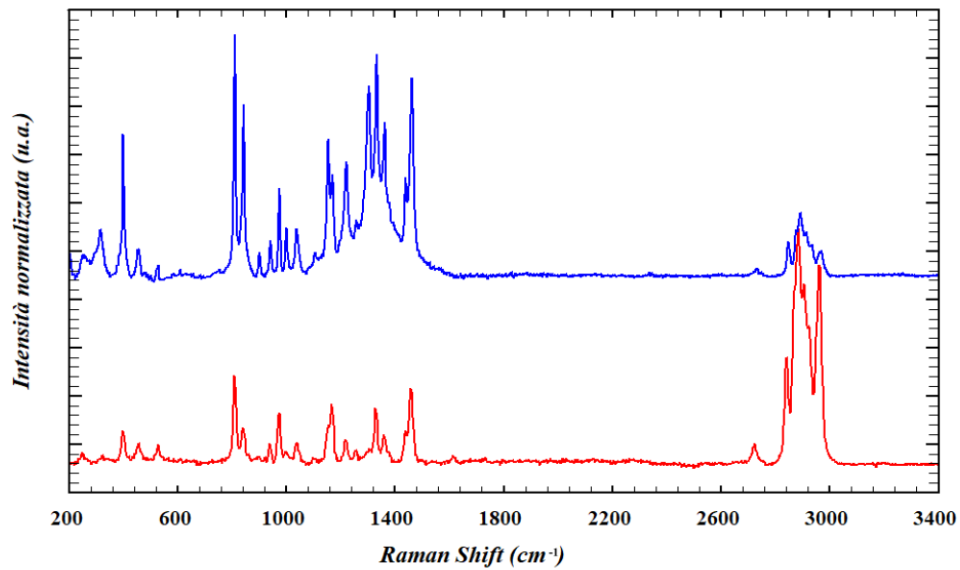


Figura 27. Confronto tra lo spettro della particella 600_1EX_14 (blu) e il polipropilene del *database* (rosso) [109].

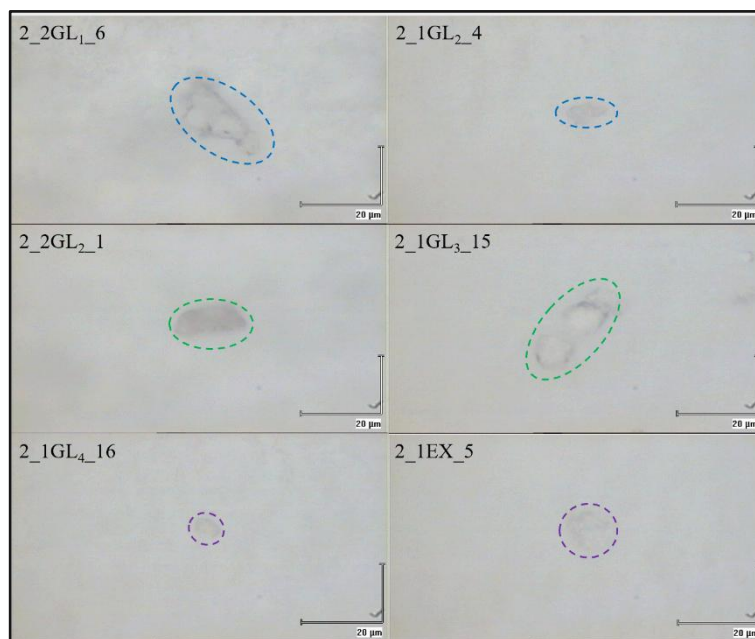


Figura 28. Alcune delle particelle di polietilene individuate nei campioni da 2 L, evidenziate utilizzando il colore che richiama il relativo spettro.

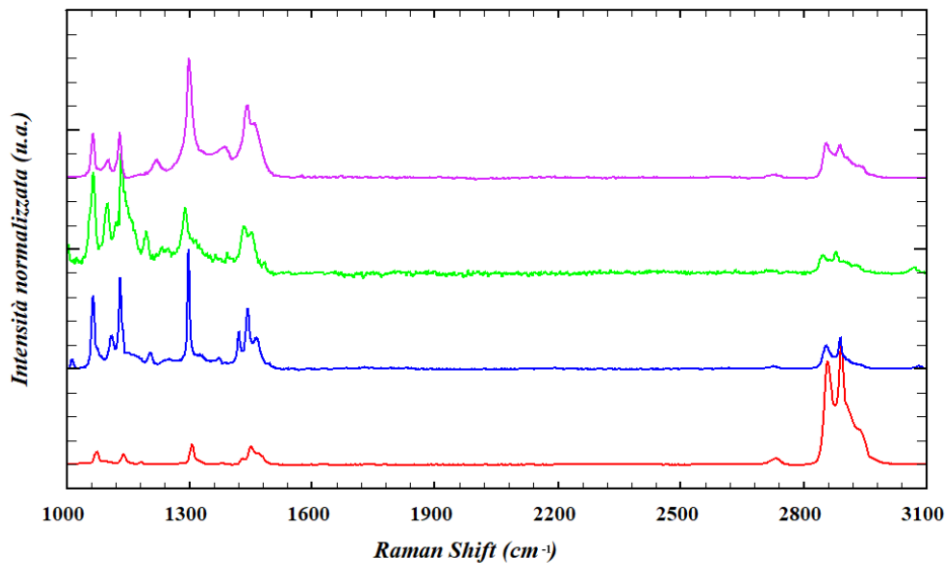


Figura 29. Confronto tra lo spettro delle particelle 2_2GL₁_6 (blu), 2_2GL₂_1 (verde), 2_1GL₄_16 (viola) e il polietilene del *database* (rosso) [109].

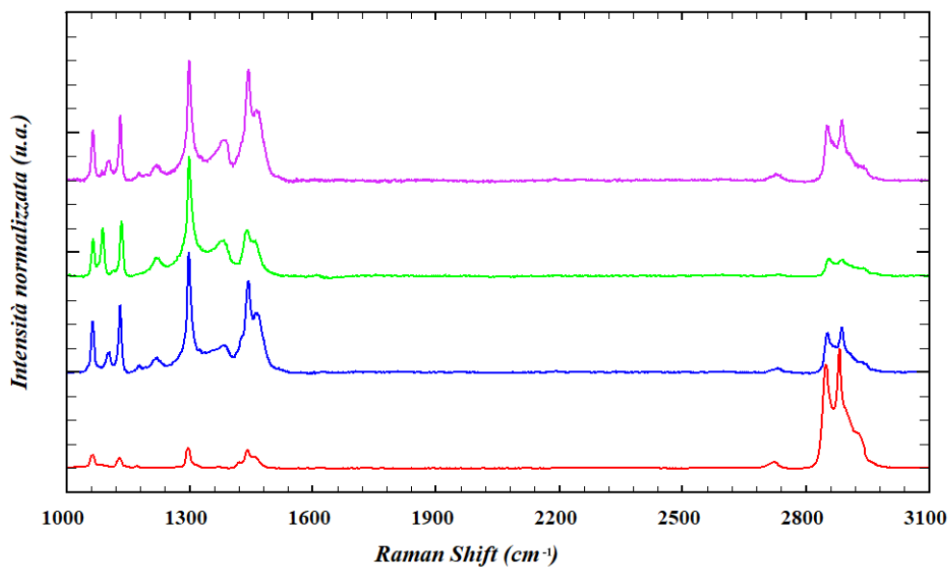


Figura 30. Confronto tra lo spettro delle particelle 2_1GL₂_4 (blu), 2_2GL₃_15 (verde), 2_1EX_5 (viola) e il polietilene del *database* (rosso) [109].

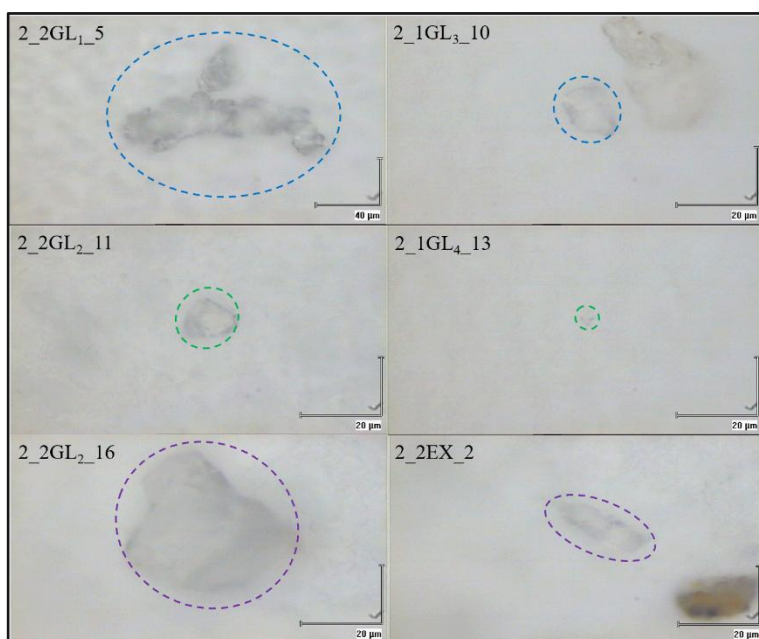


Figura 31. Alcune delle particelle di polipropilene individuate nei campioni da 2 L, evidenziate utilizzando il colore che richiama il relativo spettro.

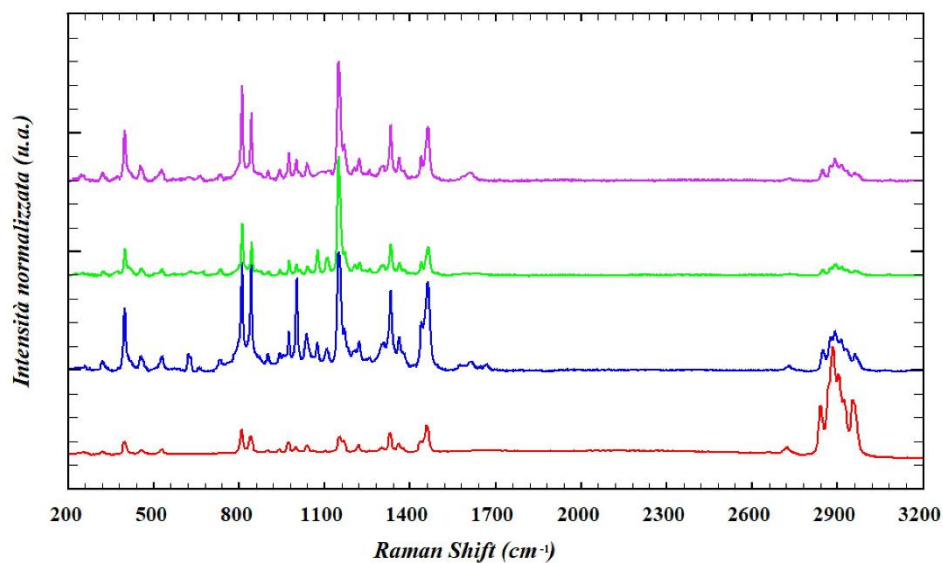


Figura 32. Confronto tra lo spettro delle particelle 2_2GL_{1_5} (blu), 2_2GL_{2_11} (verde), 2_2GL_{2_16} (viola) e il polipropilene del *database* (rosso) [109].

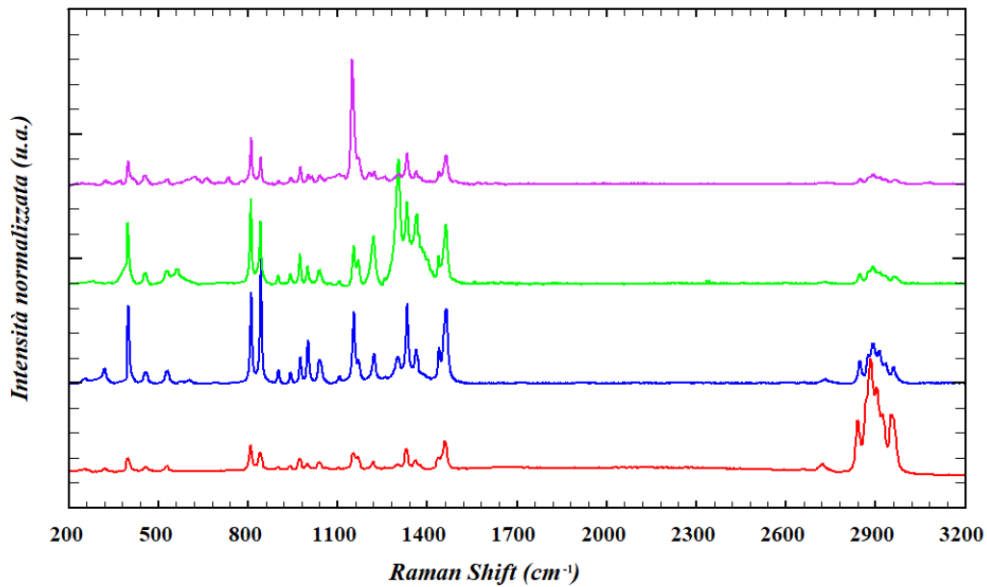


Figura 33. Confronto tra lo spettro delle particelle 2_1GL₃_10 (blu), 2_1GL₄_13 (verde), 2_2EX_2 (viola) e il polipropilene del *database* (rosso) [109]

In totale sono state identificate e caratterizzate 61 microplastiche: la composizione chimica di quest'ultime è risultata riconducibile al polietilene e al polipropilene, da confronto con spettri di riferimento presenti nel *database* [109]. Non è stata rinvenuta nessuna particella costituita dal medesimo materiale polimerico (PVC) che compone il *packaging* delle sacche di Extraneal; in quest'ultimo fluido, in generale, è stata riscontrata una minore quantità di frammenti di plastica.

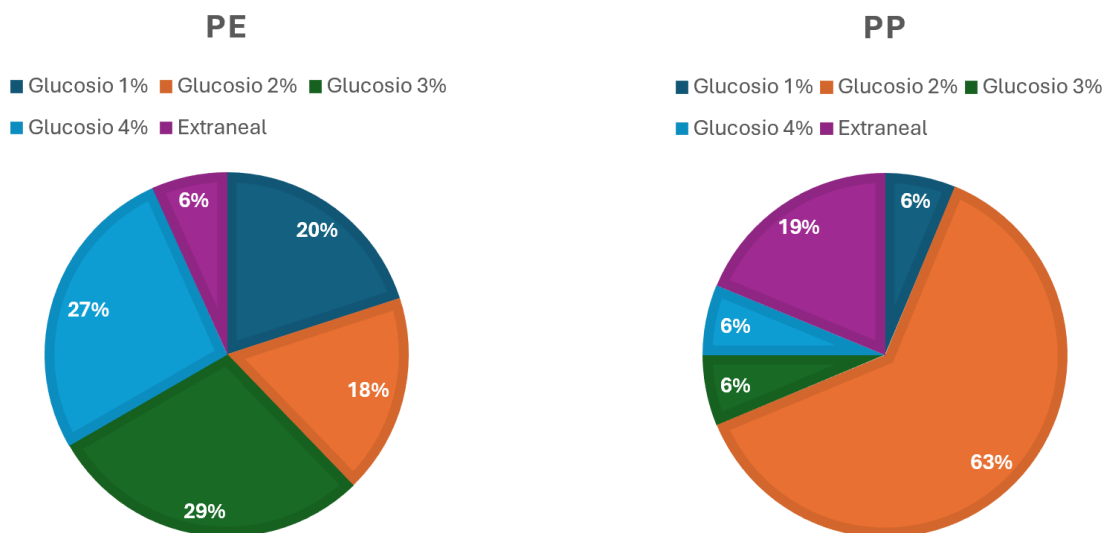


Figura 34. Percentuale delle particelle di PE (a sinistra) e PP (a destra) in funzione della composizione chimica del fluido di dialisi.

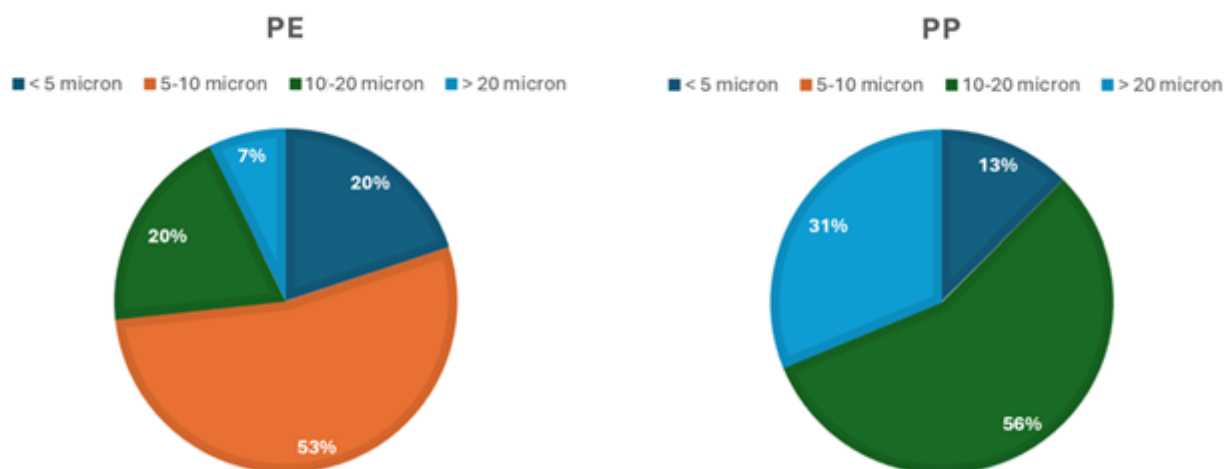


Figura 35. Percentuale delle particelle di PE (a sinistra) e PP (a destra) in funzione della loro dimensione.

L'assenza di colore nei frammenti isolati, se posta a confronto con le particelle colorate riscontrate in altre matrici, potrebbe indicare che derivino da polimeri di grado medicale, in cui l'inclusione di additivi è presumibilmente circoscritta ad agenti introdotti per ottimizzarne le proprietà meccaniche e la stabilità. L'eterogeneità dimensionale osservata, invece, potrebbe essere dovuta a un processo di frammentazione disomogeneo del polimero massivo o dal contributo di sorgenti di contaminazione multiple, ipoteticamente diversificate lungo la catena di produzione dei fluidi.

4.1.3 *Analisi degli esalati condensati*

L'analisi dei due campioni di condensato dell'aria espirata ha rilevato la presenza di alcune particelle, i cui spettri Raman hanno trovato un riscontro all'interno della banca dati SLoPP [109]. Inoltre, a differenza di quanto riscontrato nei campioni di fluidi di dialisi, nei quali i frammenti sono risultati incolori, nelle presenti matrici è stata riscontrata la presenza di una frazione di frammenti colorata. Quest'ultima ha trovato delle corrispondenze nella sezione dedicata ai pigmenti riportata nel database IRUG [110]. Le particelle caratterizzate sono state classificate con le sigle xEBC_y, dove x (pari a 1 o 2) indica il numero del campione e y rappresenta l'y-esima particella analizzata nello stesso. I risultati ottenuti sono riassunti in Tabella 7.

Tabella 7. Particelle identificate nei campioni di condensati dell'aria espirata.

Campione	Particella	Materiale	Dimensione (μm)
1EBC	1EBC_2	PE	~60
	1EBC_11	PS	~5
	1EBC_12	PS	~10
	1EBC_17	PS	~25
	1EBC_18	PE	~12
	1EBC_20	Blu di ftalocianina	~3
	1EBC_26	PA	~40
	1EBC_35	Benzimidazolone	~3
	1EBC_44	Blu di ftalocianina	~10
	1EBC_45	PE	>45
2EBC	1_EBC_1	Poliestere	~23
	1EBC_3	Poliestere	~15
	1EBC_5	PS	~4

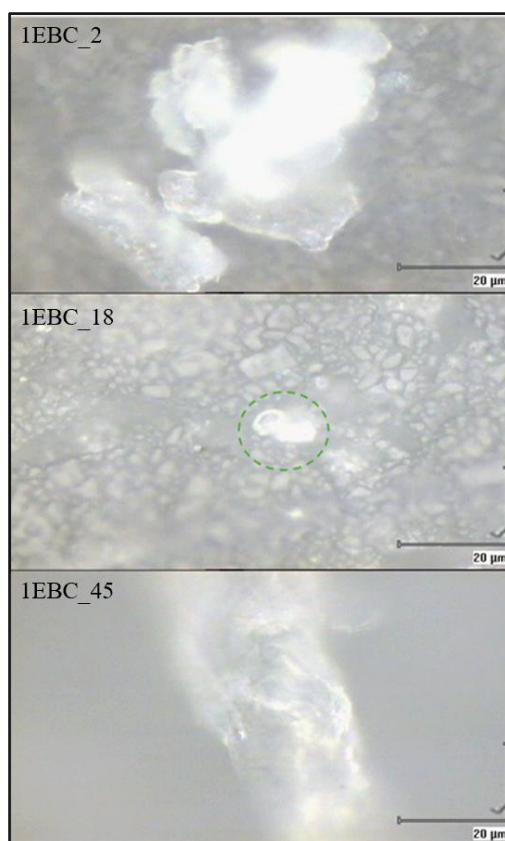


Figura 36. Particelle di polietilene individuate nel campione 1EBC.

Le particelle 1EBC_2, 1EBC_18 e 1EBC_45 hanno una corrispondenza con il PE del *database* [109] (Figura 37).

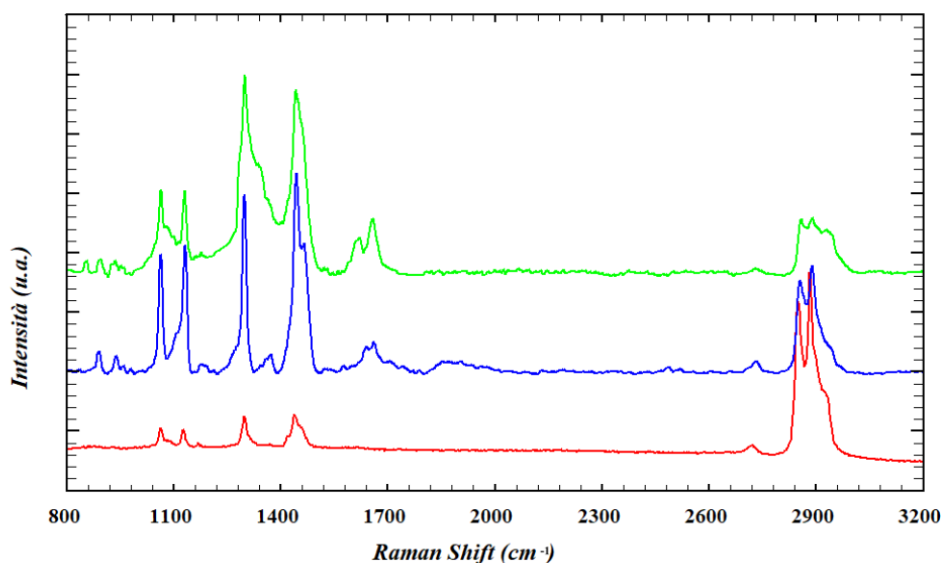


Figura 37. Confronto tra lo spettro delle particelle 1EBC_2 (blu), 1EBC_18 (verde), 1EBC_45 (viola) e il polietilene del *database* (rosso) [109].

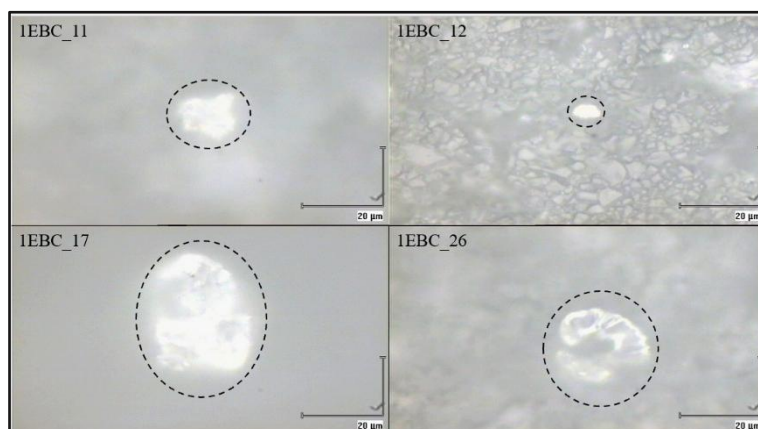


Figura 38. Particelle di polistirene e fibra di poliammide individuate nel campione 1EBC.

Il frammento 1EBC_11 ha segnali in comune con un particolare PS (Figura 39); 1EBC_12 e 1EBC_17 hanno rispettivamente una corrispondenza due PS (Figura 40 e Figura 41); lo spettro della fibra 1EBC_26 corrisponde a quello di una fibra bianca di poliammide (Figura 42).

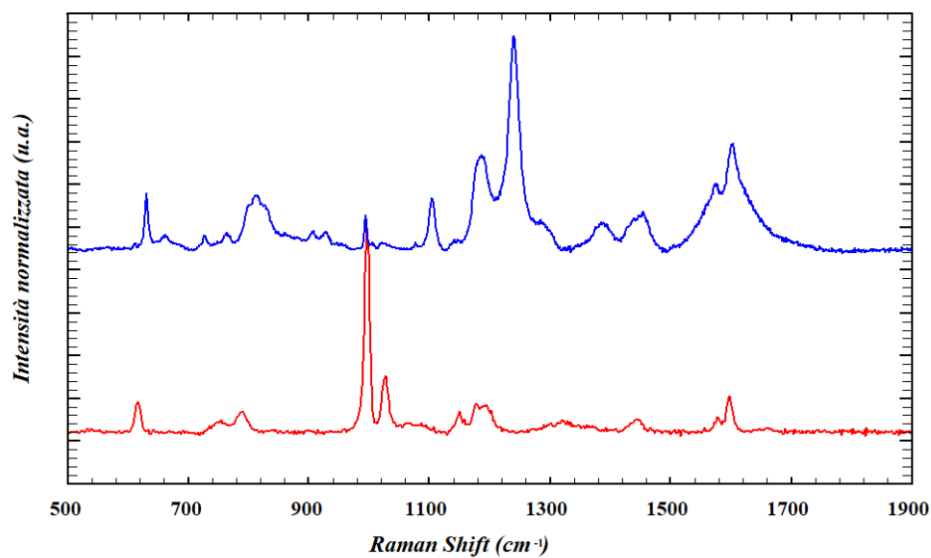


Figura 39. Confronto tra lo spettro della particella 1EBC_11 (blu) e un polistirene del *database* (rosso) [109].

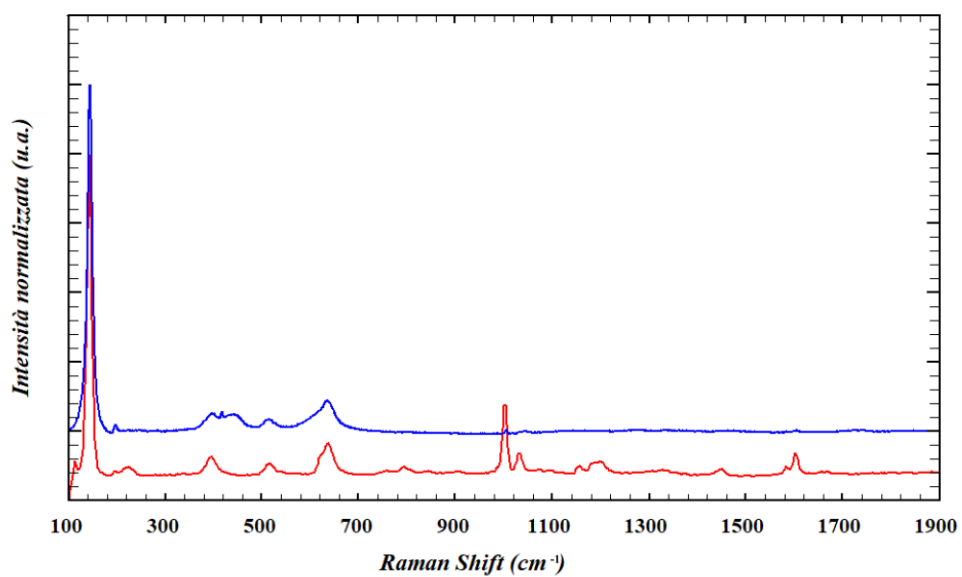


Figura 40. Confronto tra lo spettro della particella 1EBC_12 (blu) e un polistirene del *database* (rosso) [109].

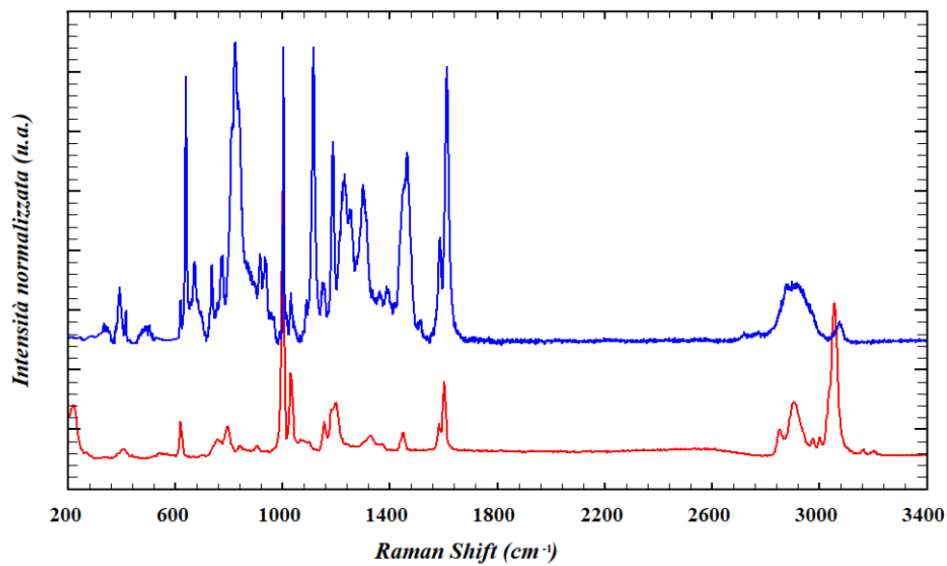


Figura 41. Confronto tra lo spettro della particella 1EBC_17 (blu) e un polistirene del *database* (rosso) [109].

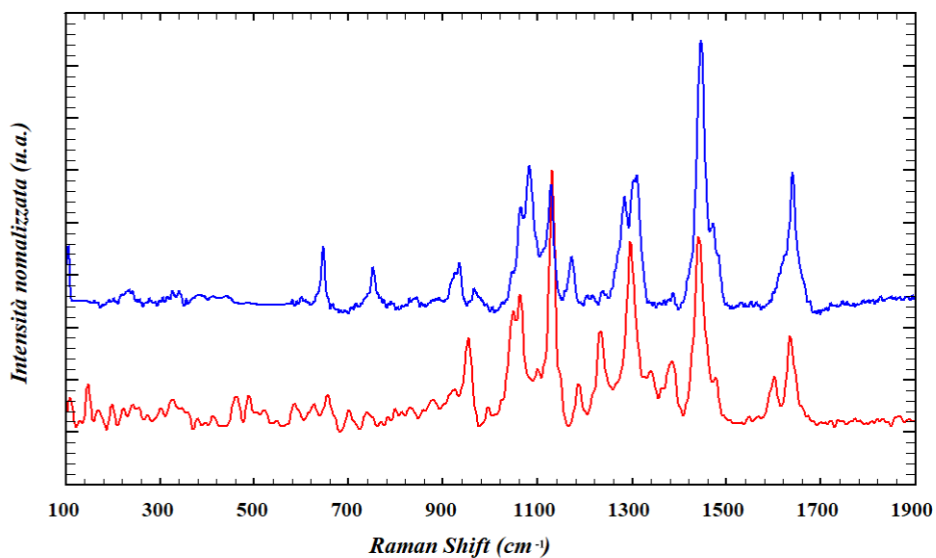


Figura 42. Confronto tra lo spettro della particella 1EBC_26 (blu) e la poliammide presente nel *database* (rosso) [109].

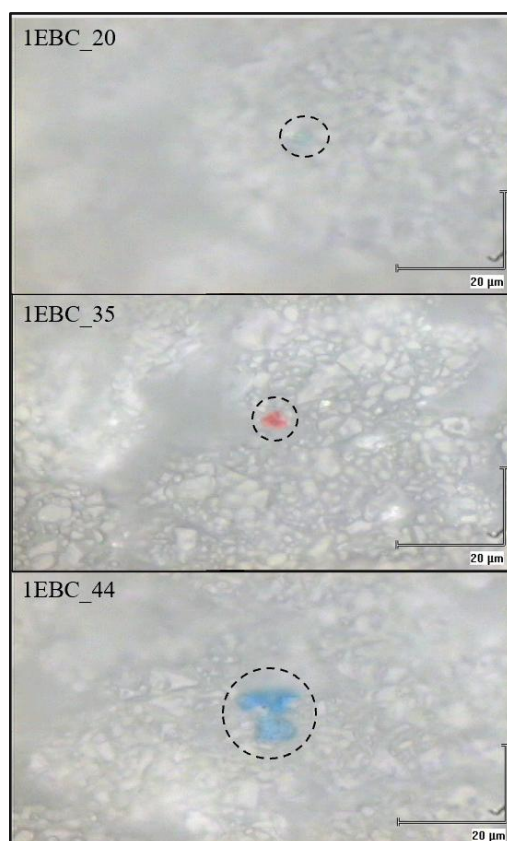


Figura 43. Particelle che hanno dato corrispondenza con pigmenti individuate nel campione 1EBC.

Nel campione 1EBC sono state identificate alcune particelle che hanno trovato corrispondenza all'interno della sezione pigmenti della banca dati IRUG. 1EBC_20 E 1EBC_44 hanno segnali in comune con il blu di ftalocianina (Figura 44); 1EBC_35 ha una corrispondenza con benzimidazolone (Figura 45), composto della famiglia dei coloranti azoici [115]. Le ftalocianine e i coloranti azoici sono pigmenti organici comunemente utilizzati per la colorazione di materie plastiche [116]; perciò, è facilmente possibile riscontrarli durante la caratterizzazione spettroscopica di campioni reali.

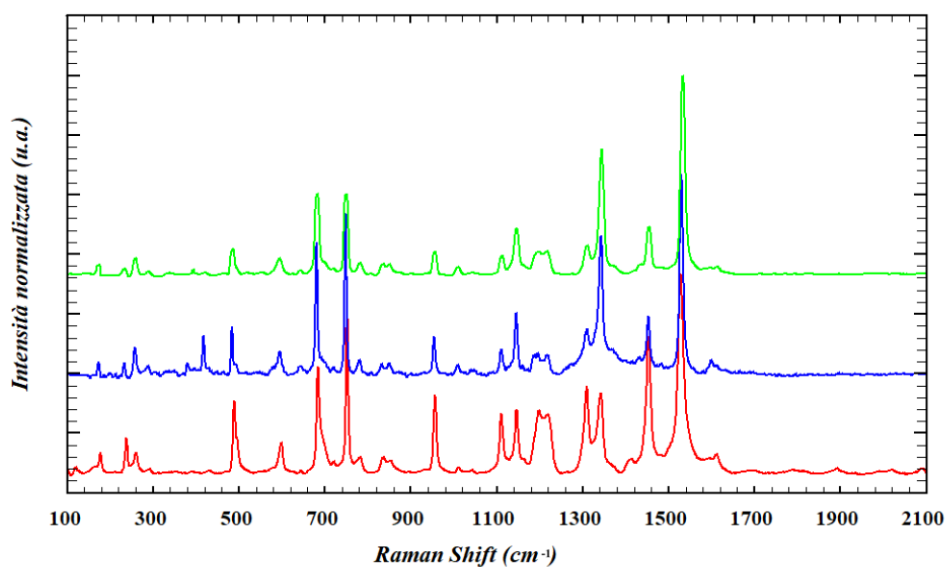


Figura 44. Confronto tra lo spettro delle particelle 1EBC_20 (blu), 1EBC_44 (verde) e il blu di ftalocianina del *database* (rosso) [110].

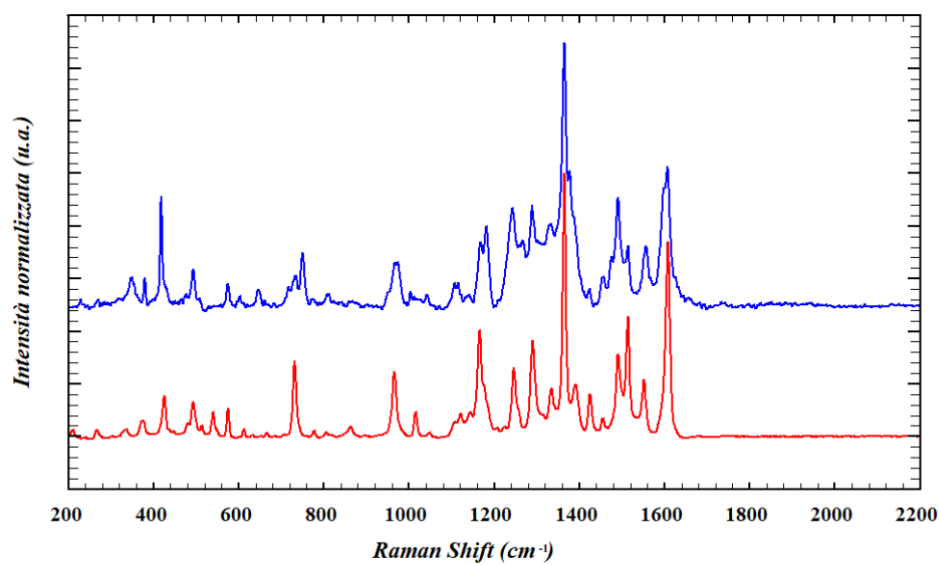


Figura 45. Confronto tra lo spettro della particella 1EBC_35 (blu) il benzimidazolone del *database* (rosso) [110].

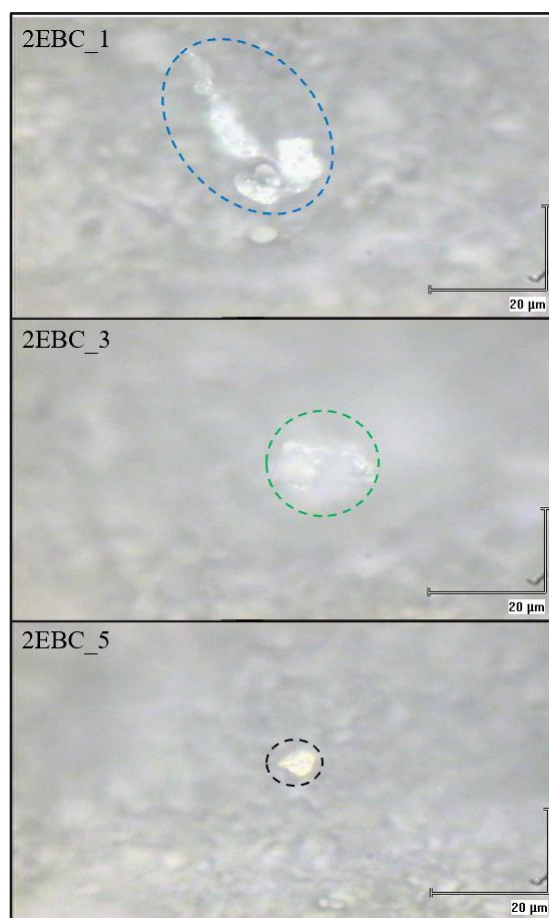


Figura 46. Particelle di poliestere e polistirene individuate nel campione 2EBC.

Nel campione 2EBC sono state identificate 2 particelle, 2EBC_1 e 2EBC_3, che hanno trovato corrispondenza con lo stesso poliestere del *database* [109] (Figura 47) e una particella, 2EBC_5, che ha segnali in comune con polistirene del *database* [109] (Figura 48).

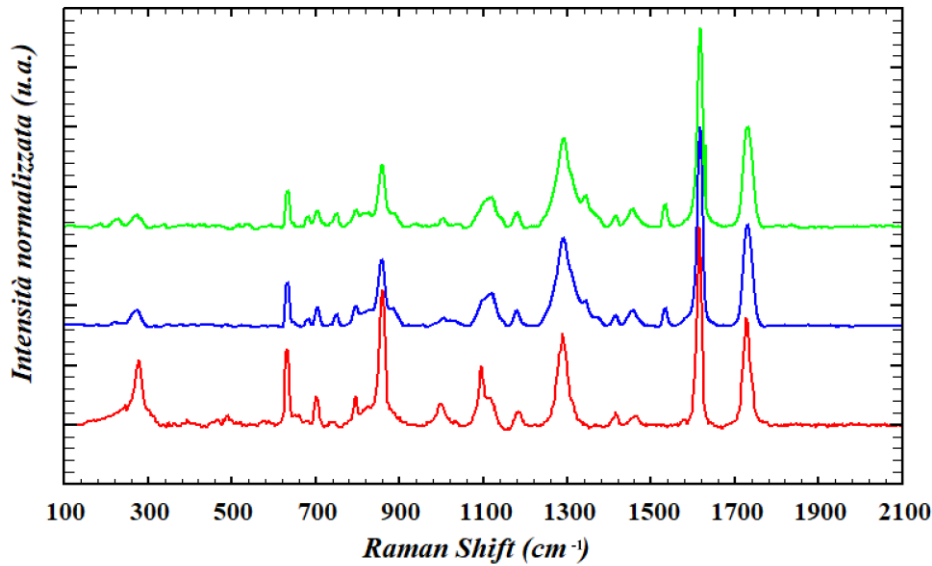


Figura 47. Confronto tra lo spettro delle particelle 2EBC_1 (blu), 2EBC_3 (verde) e il poliestere del *database* (rosso) [109].

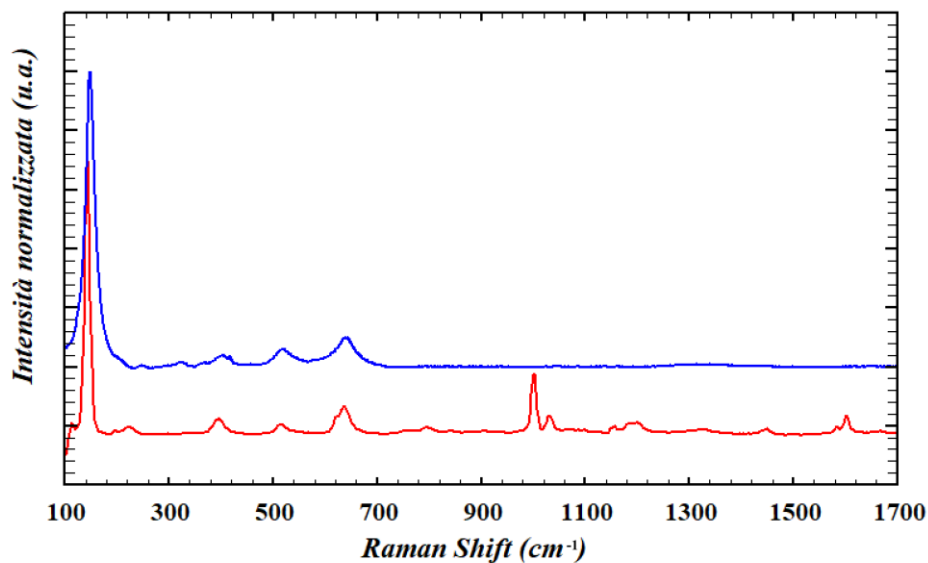


Figura 48. Confronto tra lo spettro della particella 2EBC_5 (blu) e il polistirene del *database* (rosso) [109].

In linea con quanto riscontrato in precedenza, si evidenziano alcune discrepanze tra i due spettri; in questo caso, il riferimento mostra segnali aggiuntivi. Tale fenomeno è riconducibile alla natura delle plastiche presenti nella banca dati SLoPP [109], caratterizzate dalla presenza di additivi. In questo caso ipotizzare la natura degli eventuali additivi presenta una maggiore complessità, poiché i frammenti analizzati potrebbero derivare da un'ampia varietà di materiali destinati a differenti applicazioni.

Oltre le microplastiche e i pigmenti sopra menzionati, sono state identificate anche alcune particelle di polipropilene. La presenza di questo polimero potrebbe essere riconducibile a un fenomeno di contaminazione da parte del dispositivo utilizzato per la raccolta del campione, il quale è composto da tale materiale. Ad avvalorare questa ipotesi è la somiglianza morfologica dei vari frammenti (Figura 49), che rende ragionevole ritenere che essi si siano originati dal medesimo materiale primario.

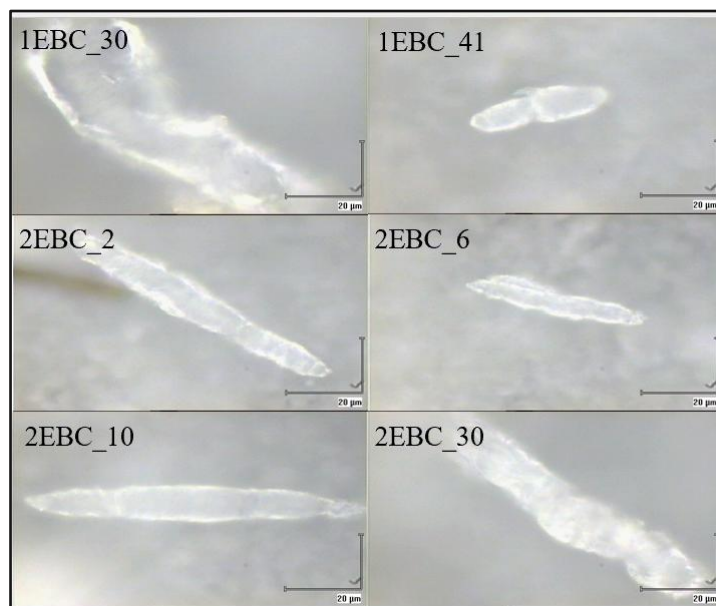


Figura 49. Alcune delle particelle di polipropilene rilevate nei due campioni di EBC.

Nello specifico, sono state identificate 4 particelle di PP nel campione 1EBC e 13 nel 2EBC. Tala discrepanza nell'abbondanza di frammenti di polipropilene tra i due campioni potrebbe essere indice di una variabilità nelle procedure di raccolta e conservazione del condensato.

In totale sono state identificate 10 microplastiche, la cui composizione è riconducibile al polietilene, al polipropilene, alla poliammide e al poliestere, da confronto con spettri di riferimento presenti nel *database* SLoPP [109]. Inoltre, ulteriori 3 particelle, sono state identificate come pigmenti utilizzati nei materiali plastici, da confronto con la libreria spettrale IRUG [110].

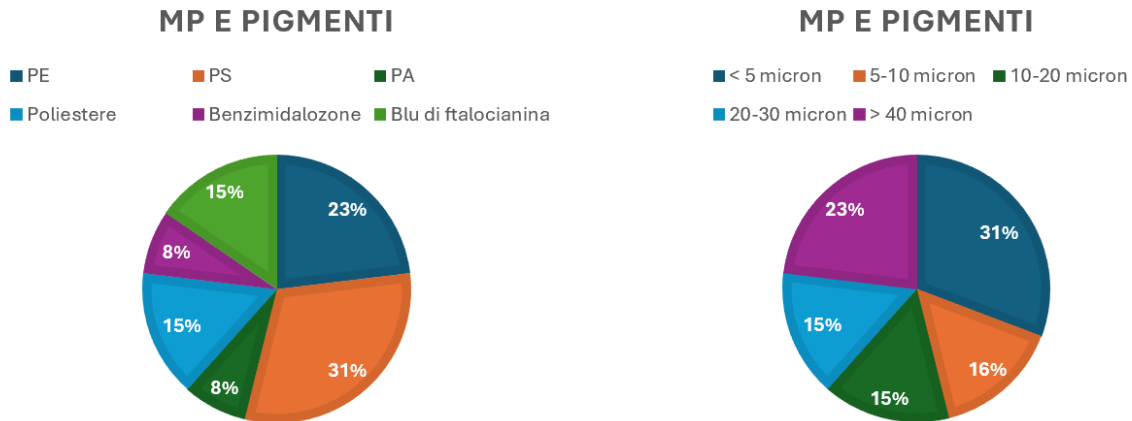


Figura 50. Percentuale delle particelle identificate in funzione della loro composizione chimica (a sinistra) e della dimensione (a destra).

Sebbene il numero di microplastiche isolate nell' EBC risulti inferiore rispetto a quello rilevato in alcuni fluidi di dialisi, tale riscontro va ponderato in base al volume analizzato (1.5 mL nell'EBC, 600 mL-2 L nei fluidi di dialisi). Questo dato, se normalizzato al volume, suggerisce un livello di contaminazione rilevante nell'EBC. Inoltre, nei campioni di condensato dell'aria espirata mostrano un'ampia eterogeneità composizionale e una morfologia varia: si evidenziano fibre, verosimilmente riconducibili a tessuti sintetici, e frammenti colorati.

4.2 Caratterizzazione dei campioni standard

4.2.1 *Analisi del diametro idrodinamico e del potenziale Zeta*

Le analisi DLS ed LDE sono state eseguite su sospensioni acquose di microplastiche standard con un duplice obiettivo. In primo luogo, l'indagine è stata finalizzata a valutare la variazione delle proprietà chimico-fisiche in funzione dei parametri caratterizzanti la sospensione; quali la concentrazione del polimero, il pH del mezzo disperdente e la sua temperatura. In secondo luogo, lo studio ha mirato a esplorare i limiti operativi di tali caratterizzazioni, in modo da comprendere l'applicabilità e i confini dell'approccio su campioni reali.

I valori di diametro idrodinamico (*size*) sono riportati in nanometri (nm), parametro a cui è associato il Pdl, compreso tra 0 e 1. I valori del potenziale Zeta (*Zeta*) sono invece espressi in millivolt (mV) e associati al valore di conducibilità della soluzione rilevato dallo strumento, in millisiemens su centimetro (mS/cm). Per entrambe le tipologie di analisi, vengono riportati a titolo d'esempio solamente i grafici ottenuti da alcuni replicati. I risultati relativi a ciascuna sospensione sono espressi come media \pm deviazione standard delle tre misure complessive, che vengono fornite direttamente dal *software* dello strumento. La mancata indicazione della deviazione standard per alcuni valori di conduttività è associata a una variabilità trascurabile tra le repliche (ossia con un ordine di grandezza pari a 10^{-6}).

Il primo parametro ad essere sistematicamente variato e studiato è stata la concentrazione di PE e i risultati ottenuti dall'analisi delle sospensioni sono raccolti in Tabella 8. Per lo strumento Zetasizer non esiste una concentrazione precisa alla quale effettuare le analisi, bensì viene fornito un *range* consigliato, che a sua volta dipende dalla dimensione media delle particelle, dalla loro natura, dalla tendenza all'aggregazione e da altri fattori. Per tale motivo è stato deciso di indagare il suo effetto sui risultati strumentali ottenuti. Di seguito vengono riportati alcuni dei grafici rappresentativi delle misure effettuate (Figura 51, Figura 52, Figura 53 e Figura 54). In ciascun grafico, i tre replicati sono distinti da un colore specifico: il tracciato rosso identifica la prima misura, quello blu la seconda e quello verde la terza.

Tabella 8. Risultati delle analisi delle sospensioni di PE in funzione della concentrazione di MP.

Conc. (mg/mL)	Size (nm)	Pdl	Zeta (mV)	cond. (mS/cm)
0.01	692 \pm 339	0.7 \pm 0.3	-38.4 \pm 0.6	0.003
0.025	747 \pm 536	0.7 \pm 0.3	-40 \pm 1	0.009 \pm 0.009
0.05	1044 \pm 686	0.7 \pm 0.4	-40 \pm 3	0.01 \pm 0.01
0.1	1038 \pm 313	0.6 \pm 0.3	-47 \pm 1	0.002
0.25	1343 \pm 218	0.38 \pm 0.02	-49 \pm 1	0.016 \pm 0.005
0.5	1436 \pm 282	0.5 \pm 0.4	-60 \pm 1	0.005

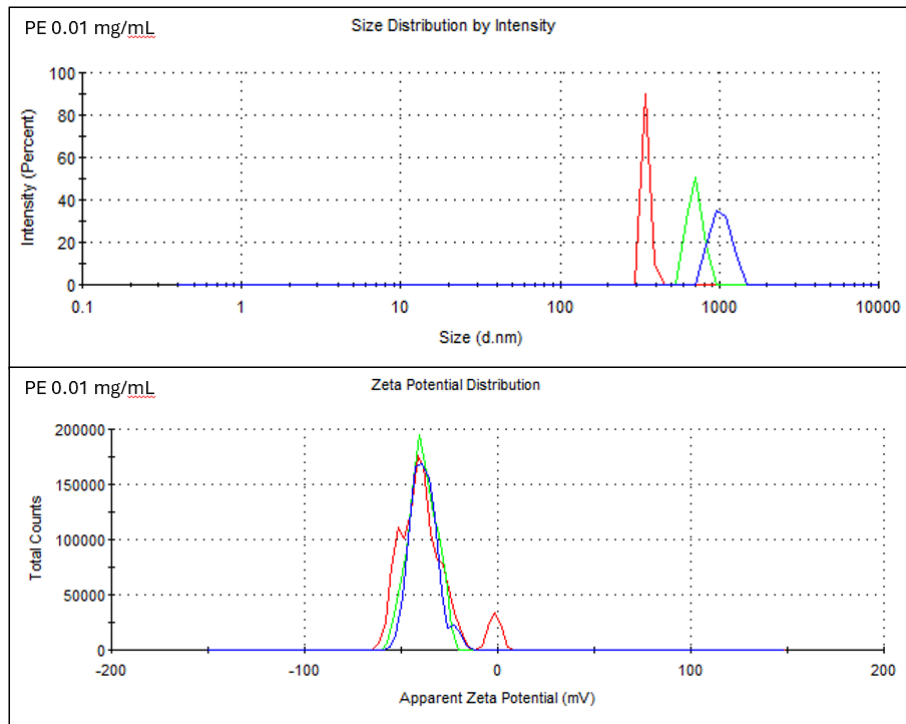


Figura 51. Triplicato della misura di diametro idrodinamico (in alto) e di potenziale Zeta (in basso) della sospensione di PE in H₂O 0.01 mg/mL.

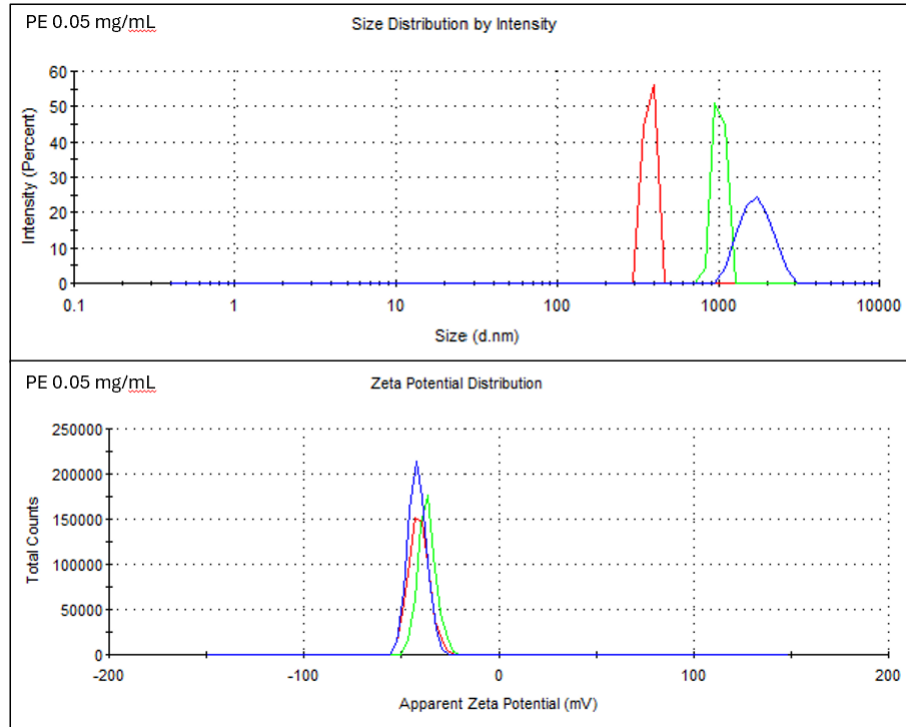


Figura 52. Triplicato della misura di diametro idrodinamico (in alto) e di potenziale Zeta (in basso) della sospensione di PE in H₂O 0.05 mg/mL.

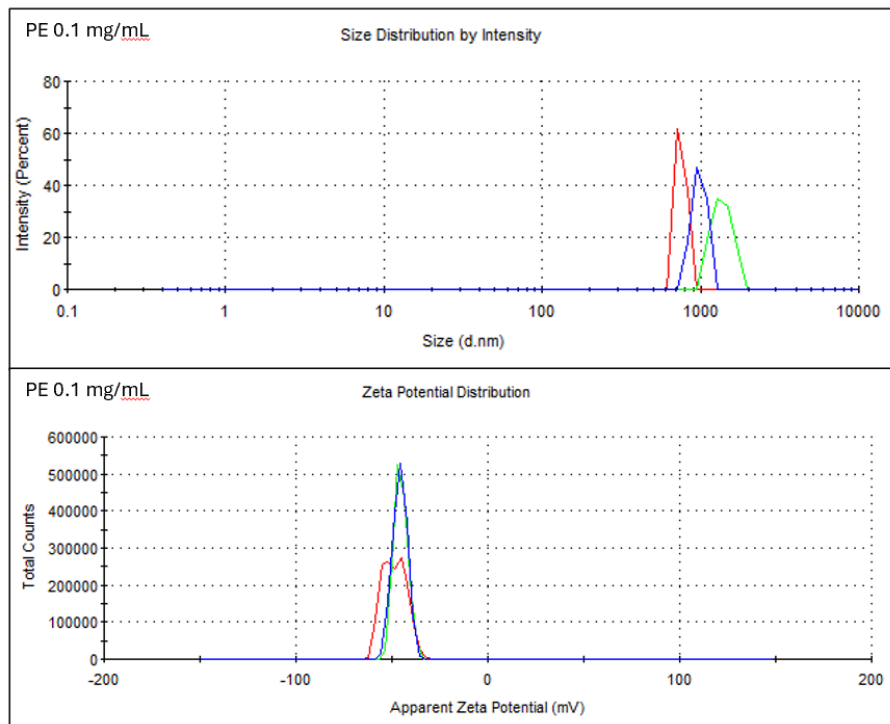


Figura 53. Triplicato della misura di diametro idrodinamico (in alto) e di potenziale Zeta (in basso) della sospensione di PE in H₂O 0.1 mg/mL

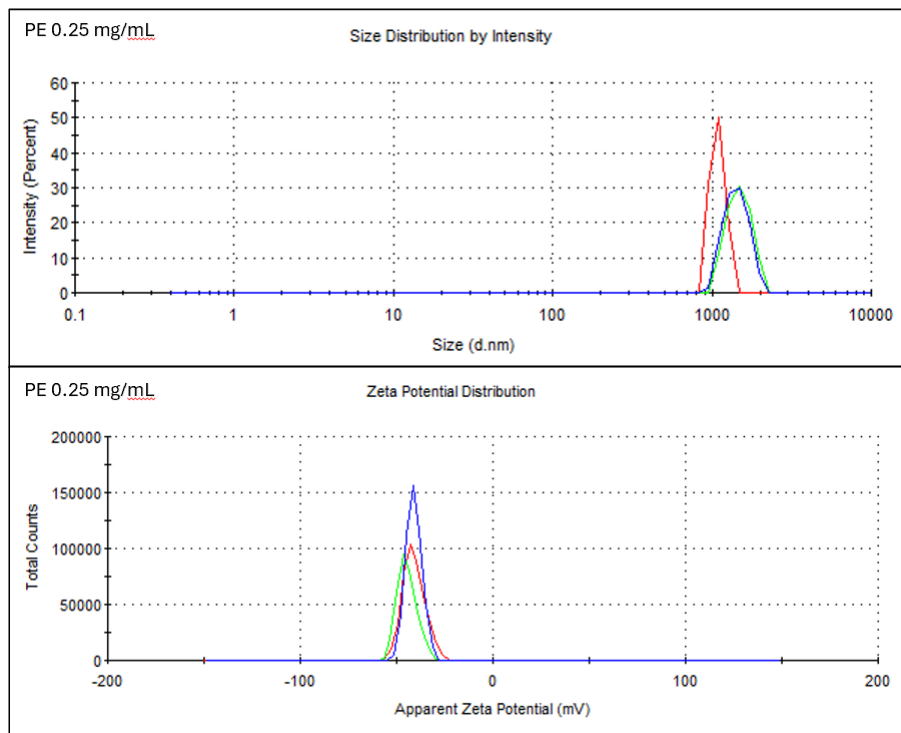


Figura 54. Triplicato della misura di diametro idrodinamico (in alto) e di potenziale Zeta (in basso) della sospensione di PE in H₂O 0.25 mg/mL.

Si può osservare, dai risultati riportati in Tabella 8, che i valori medi del diametro idrodinamico delle sospensioni di particelle di PE non siano sempre sovrapponibili con l'intervallo dimensionale riportato dal produttore delle microplastiche standard utilizzate (1-4 μm). Va però precisato che non viene riportata la frazione di particelle nelle rispettive dimensioni. Si può ulteriormente osservare come, in alcuni casi, l'analisi delle singole repliche riportate nelle Figure 51 e 52, evidenzia misure che restituiscono un valore significativamente inferiore. La discrepanza tra le tre misure consecutive suggerisce una limitata riproducibilità dell'analisi per quanto riguarda le specifiche concentrazioni impiegate. Tuttavia, all'aumentare della concentrazione, i tre tracciati tendono a convergere (Figura 53 e Figura 54). Parallelamente, le misure del potenziale Zeta sulle sospensioni analizzate rivelano una carica superficiale uniforme e negativa; i valori, quando inferiori a -30 mV, confermano la stabilità delle particelle in sospensione. Il progressivo incremento del valore assoluto in funzione della concentrazione può indicare che le sospensioni più concentrate possono stabilizzare ulteriormente il sistema, osservazione sostenuta dalla maggiore convergenza dei tre tracciati di ogni misura.

Vista la maggiore riproducibilità ottenuta dalle misure eseguite a concentrazioni maggiori, si è scelto di proseguire le analisi sui campioni con concentrazione pari a 0.1 mg/mL e 0.25 mg/mL, andando a variare il pH delle soluzioni per indagare come questo potesse influenzare i valori di diametro idrodinamico e potenziale Zeta. In Tabella 9 si riportano i risultati ottenuti da questa parte dello studio sui campioni a concentrazione pari a 0.1 mg/mL.

Tabella 9. Risultati delle analisi delle sospensioni di PE a 0.1 mg/mL in funzione del pH.

pH	Size (nm)	Pdl	Zeta (mV)	cond. (mS/cm)
1.28	301±181	1	4±8	31±0.1
3.08	749±768	0.6±0.2	0.9±0.7	0.476±0.007
5.13	859±475	0.8±0.3	-22.9±0.6	0.213±0.001
7.10	1230±624	0.7±0.3	-27.9±0.4	0.197
9.23	1377±500	0.5±0.2	-24.9±0.6	0.1
11.03	1002±599	0.7±0.3	-26±1	0.482±0.005
12.97	322±557	0.360	-20.8±0.5	14.1±0.3

I grafici ottenuti per le sospensioni a pH 1.28 e 12.97 non vengono riportati, in quanto, a causa dell'elevata conduttività del mezzo (>10 mS/cm), il software dello strumento non è stato in grado di riportare i grafici i tracciati, sebbene abbia riportato il valore medio del potenziale Zeta del campione.

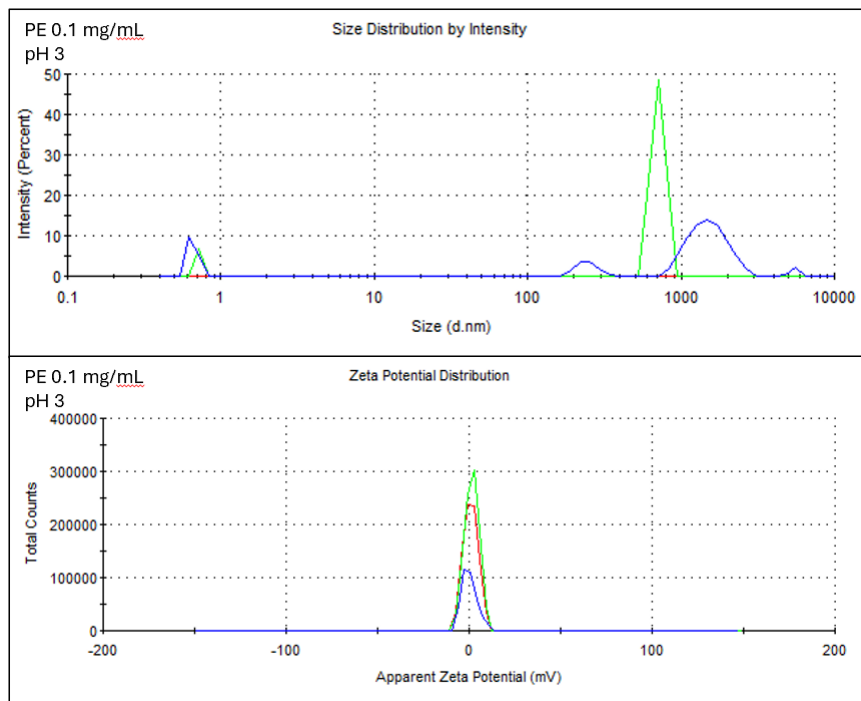


Figura 55. Triplicato della misura di diametro idrodinamico (in alto) e di potenziale Zeta (in basso) della sospensione di PE 0.1 mg/mL a pH 3.

L'analisi condotta a pH 3.08 mostra una buona riproducibilità della misura del potenziale Zeta, il quale si stabilizza a valori prossimi allo zero. Questo conferma il raggiungimento del punto isoelettrico, o punto di carica zero, in cui le particelle non possiedono una carica elettrica netta superficiale. L'assenza di forze di repulsione determina la loro instabilità nella sospensione acquosa e, di conseguenza, la loro precipitazione. Tale instabilità comporta anomalie significative nella determinazione del diametro idrodinamico. L'assenza del primo tracciato (rosso), al quale corrisponde un valore pari a 0 nm, indica che le particelle non siano sospese, bensì precipitate sul fondo della cuvetta e sottratte all'interazione con il fascio laser. È pertanto ragionevole dedurre che i segnali registrati nei tracciati successivi siano da considerarsi artefatti strumentali, originati dalla mancanza di campione in sospensione.

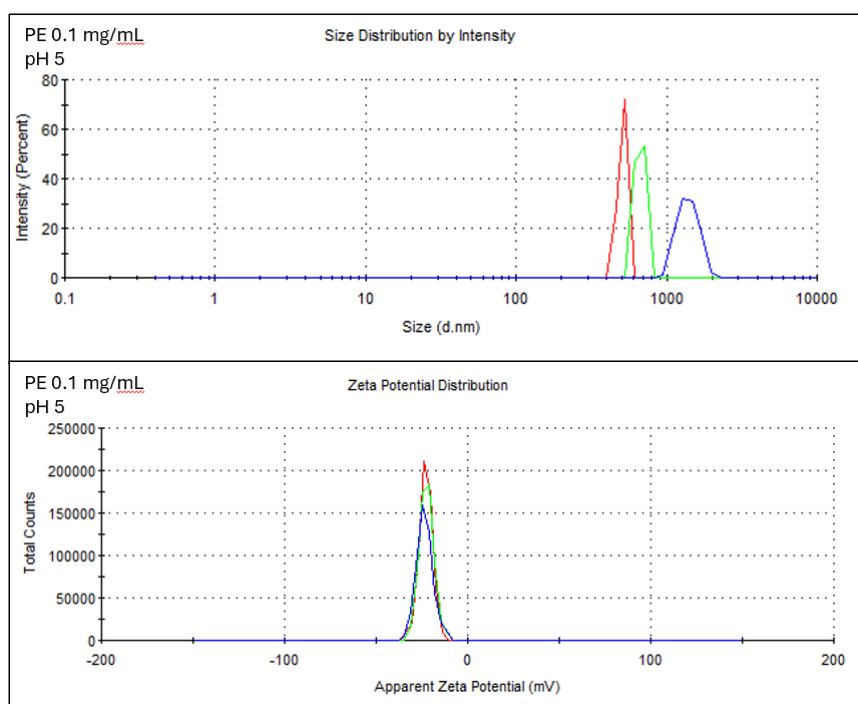


Figura 56. Triplicato della misura di diametro idrodinamico (in alto) e di potenziale Zeta (in basso) della sospensione di PE 0.1 mg/mL a pH 5.

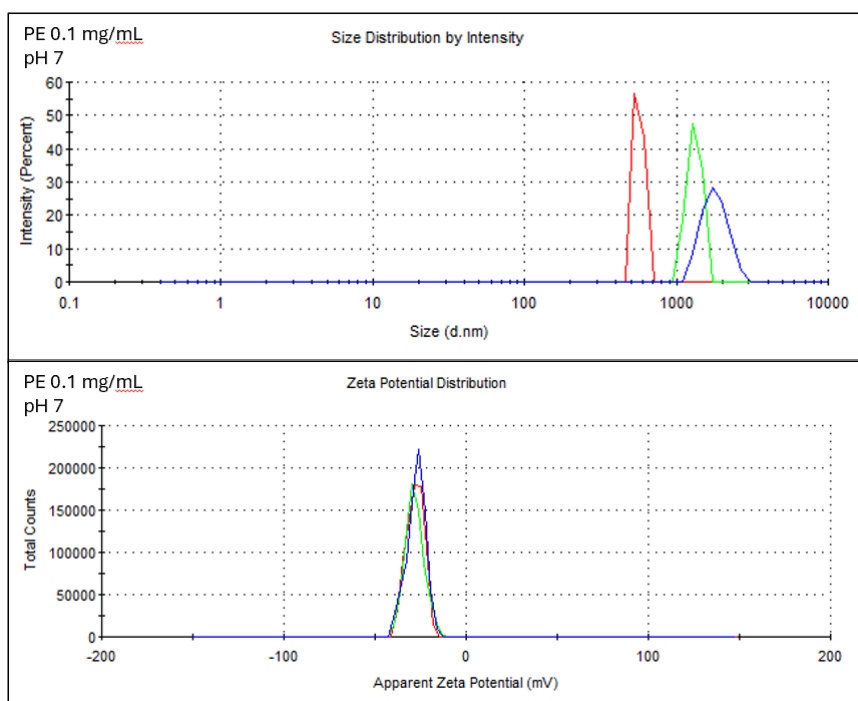


Figura 57. Triplicato della misura di diametro idrodinamico (in alto) e di potenziale Zeta (in basso) della sospensione di PE 0.1 mg/mL a pH 7.

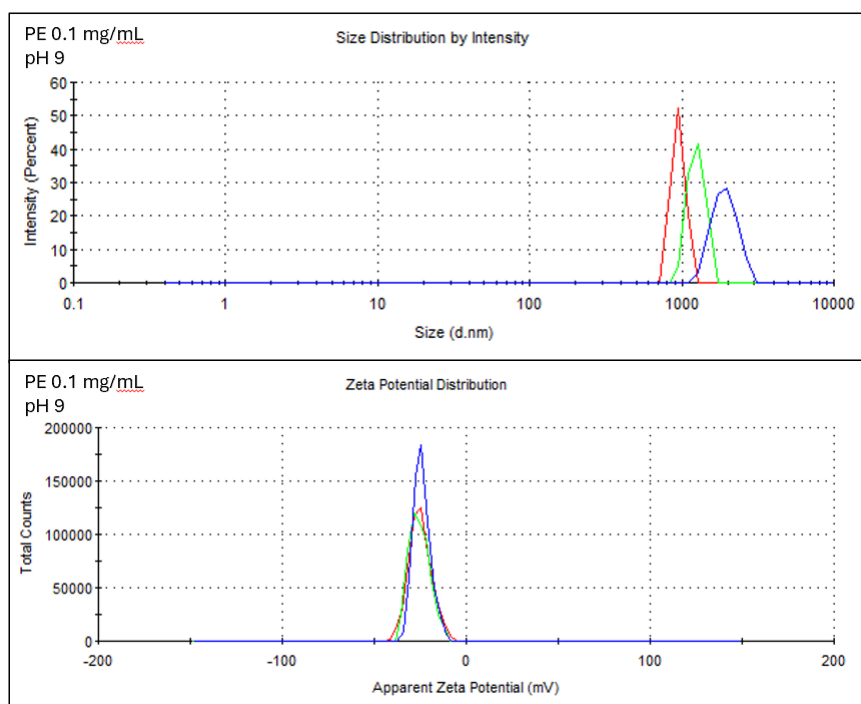


Figura 58. Triplicato della misura di diametro idrodinamico (in alto) e di potenziale Zeta (in basso) della sospensione di PE 0.1 mg/mL a pH 9.

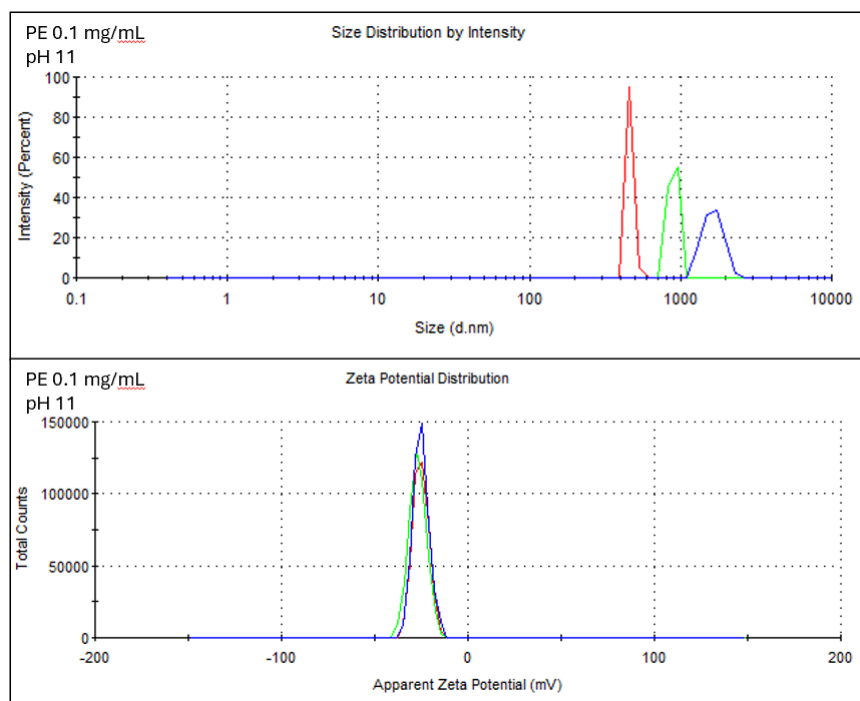


Figura 59. Triplicato della misura di diametro idrodinamico (in alto) e di potenziale Zeta (in basso) della sospensione di PE 0.1 mg/mL a pH 11.

Le analisi condotte restituiscono misure di potenziale Zeta ampiamente riproducibili tra loro. Nell'intervallo di pH studiato è stato possibile evidenziare il punto di carica zero e la conseguente inversione di carica da positiva a negativa. Tra pH 5 e pH 11 il potenziale Zeta si stabilizza intorno a un valore medio pari a -25 mV. La sospensione è prossima al valore di soglia (-30 mV) per la stabilità colloidale, ma non viene raggiunto, per questo motivo le misure di diametro idrodinamico presentano lo stesso comportamento evidenziato in precedenza. Un ulteriore fattore da considerare risiede nel confronto con il potenziale Zeta registrato durante lo studio in funzione della concentrazione. In acqua deionizzata, infatti, alla medesima concentrazione polimerica è stato misurato un valore pari a -47 mV, indice di una sospensione altamente stabile. Una discrepanza così marcata potrebbe evidenziare l'effetto destabilizzante indotto dalla presenza di specie ioniche (acide e basiche) nel mezzo di dispersione; ciò è in accordo con quanto riportato dalla teoria, secondo la quale, in presenza di ioni in soluzione, il doppio strato elettrico diventa più compatto e il valore assoluto del potenziale Zeta diminuisce.

Le stesse analisi in funzione del pH sono state condotte anche su sospensioni con concentrazione pari a 0.25 mg/mL, i cui risultati sono riportati in Tabella 10.

Tabella 10. Risultati delle analisi delle sospensioni di PE a 0.25 mg/mL in funzione del pH.

pH	Size (nm)	Pdl	Zeta (mV)	cond. (mS/cm)
1.55	748±646	0.8±0.3	3.4±0.5	31±0.1
3.36	460±330	0.9±0.1	-10±1	0.277
5.06	2266±367	0.17±0.08	-57±2	0.0434
7.03	2005±380	0.2±0.1	-68.6±0.5	0.0937
9.11	2063±492	0.2±0.1	-66±2	0.085±0.002
11.01	2157±474	0.13±0.07	-75±2	0.533±0.007
13.02	560±850	0.6±0.4	-15.1±0.6	14.6±0.4

Anche in questo caso, a causa dell'alta conduttività del mezzo di dispersione, lo strumento non è stato in grado di registrare i tracciati per le sospensioni a pH 1.55 e 13.02.

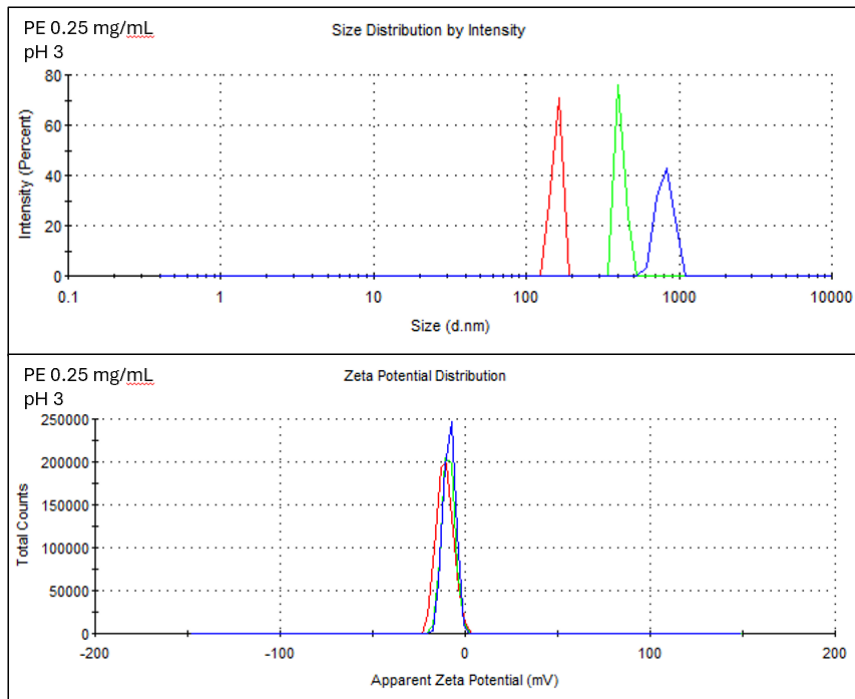


Figura 60. Triplicato della misura di diametro idrodinamico (in alto) e di potenziale Zeta (in basso) della sospensione di PE 0.25 mg/mL a pH 3.

L'analisi condotta a pH 3.36 mostra un potenziale Zeta negativo che si stabilizza a -10 mV. Il valore negativo e la concordanza tra i tre tracciati suggerisce che il punto di zero carica è stato superato; nonostante ciò, il sistema si trova ancora in una situazione altamente instabile, questo può fornire una spiegazione al perché il diametro idrodinamico riscontrato sia insolitamente basso e le misure poco riproducibili, come già osservato per le sospensioni meno concentrate a 0.1 mg/mL.

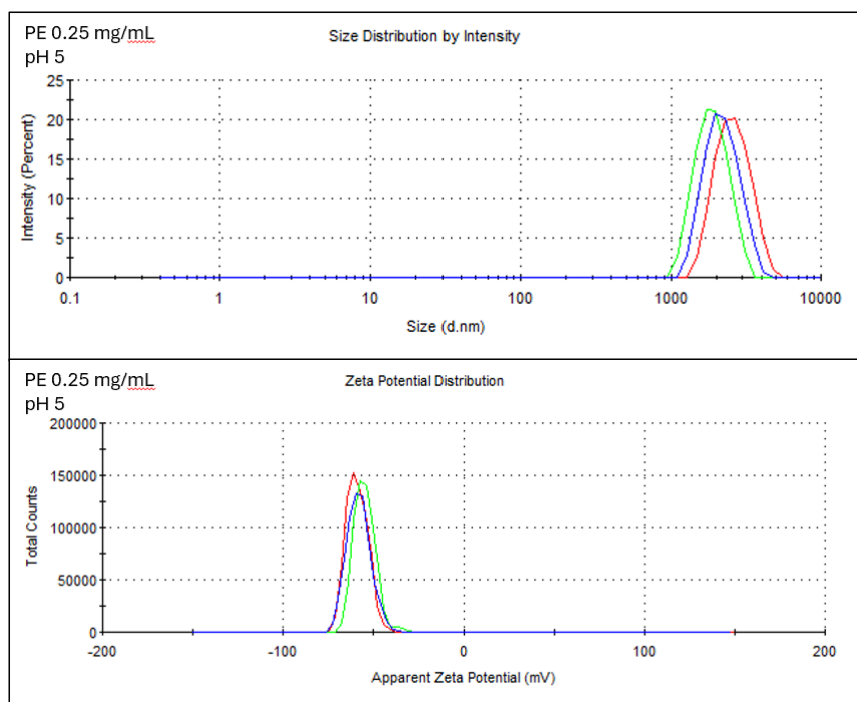


Figura 61. Triplicato della misura di diametro idrodinamico (in alto) e di potenziale Zeta (in basso) della sospensione di PE 0.25 mg/mL a pH 5.

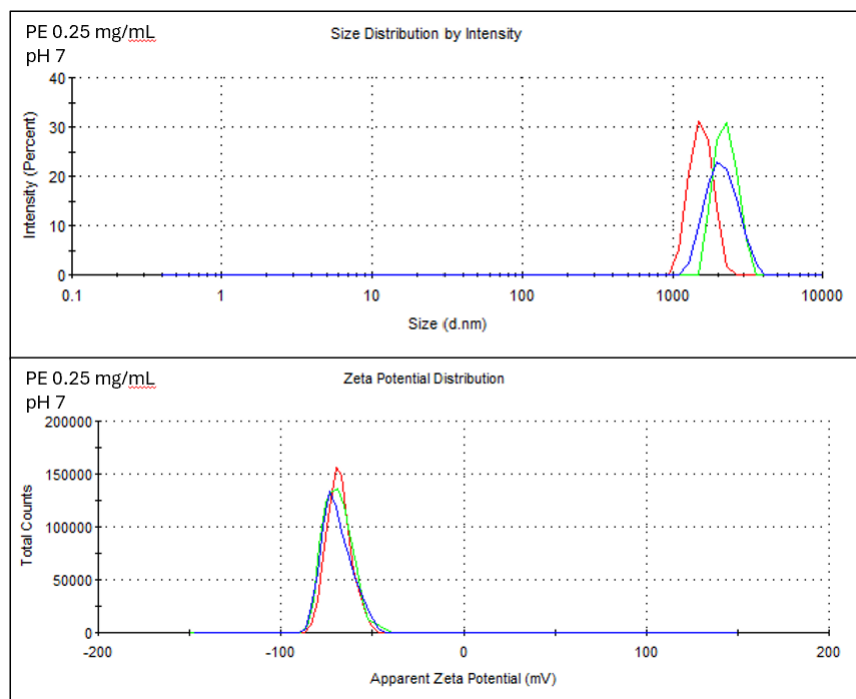


Figura 62. Triplicato della misura di diametro idrodinamico (in alto) e di potenziale Zeta (in basso) della sospensione di PE 0.25 mg/mL a pH 7.

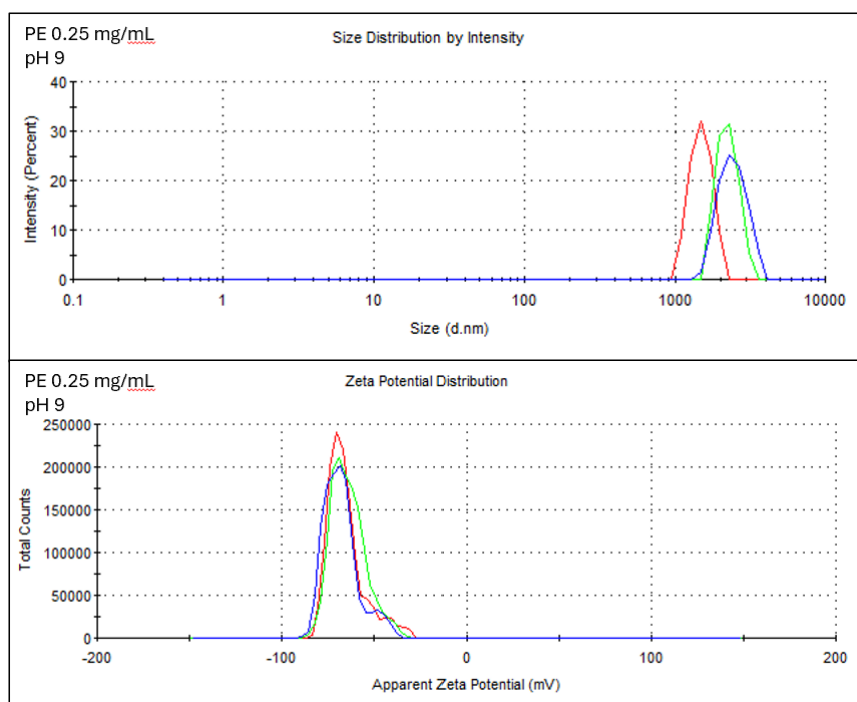


Figura 63. Triplicato della misura di diametro idrodinamico (in alto) e di potenziale Zeta (in basso) della sospensione di PE 0.25 mg/mL a pH 9.

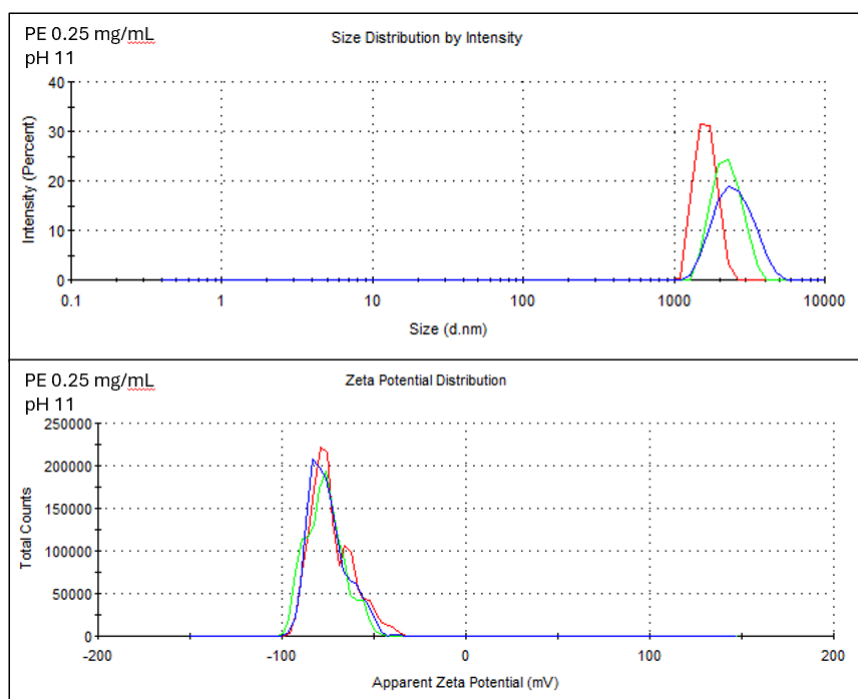


Figura 64. Triplicato della misura di diametro idrodinamico (in alto) e di potenziale Zeta (in basso) della sospensione di PE 0.25 mg/mL a pH 11.

Durante le analisi condotte nell'intervallo compreso tra pH 5 e pH 11 si riscontrano valori di potenziale Zeta compresi tra -57 mV e -75 mV, indici del fatto che, in tali condizioni sperimentali, la sospensione è altamente stabile. La stabilità si riscontra anche nelle misure di diametro idrodinamico; i tracciati relativi alle diverse repliche mostrano popolazioni dimensionali concordi con la dimensione certificata delle particelle. Inoltre, si riscontra una particolare riproducibilità nella misura effettuata a pH 5.06. Questa particolare combinazione tra concentrazione di particelle e pH potrebbe essere pertanto ottimale per il PE.

Le diverse anomalie riscontrate durante le repliche delle misure dei valori del diametro idrodinamico, hanno comportato la necessità di svolgere un'ulteriore analisi dimensionale mediante microscopia elettronica, in modo tale da accertare l'effettiva distribuzione dimensionale delle particelle di polietilene di riferimento. La caratterizzazione mediante microscopia viene riportata successivamente nel paragrafo 4.2.2 e cui si rimanda per la discussione critica dei risultati ottenuti dal confronto tra DLS e SEM.

La stessa indagine DLS ed LDE è stata svolta su particelle di polistirene (PS) monodisperse, anch'esse commerciali e fornite, in questo caso, già in sospensione acquosa, così da considerare la diversa composizione e stato di dispersione, valutando il loro effetto sulle misure. In questo modo sono state considerate diverse casistiche che hanno permesso di comprendere meglio i risultati ottenuti con questa tecnica.

Sono stati analizzati, attraverso misure di diametro idrodinamico, alcuni campioni in funzione della concentrazione, in modo da valutare eventuali variazioni nella risposta dello strumento e selezionare la concentrazione migliore su cui effettuare ulteriori analisi. I risultati ottenuti per le misure in funzione della concentrazione sono riportati in Tabella 11.

Tabella 11. Risultati delle analisi delle sospensioni di PS in funzione della concentrazione di MP, a partire dalla soluzione madre (105 mg/mL).

Conc. (mg/mL)	Size (nm)	Pdl
0.00105	356±73	0.7±0.2
0.0105	763±135	0.3±0.1
0.105	678±121	0.2±0.2
1.05	233±24	0.1±0.2
10.5	7.9±0.1	0.172±0.006
105	9.8±0.9-102±1	0.548±0.009

Anche nel caso del polistirene, i valori di diametro idrodinamico sono risultati inferiori rispetto alla dimensione certificata (1 µm). Il grafico ottenuto alla concentrazione più bassa (0.0015 mg/mL) evidenzia una marcata discordanza tra i tre replicati (Figura 65 a). Al contrario, le due concentrazioni superiori, pur restituendo valori di diametro idrodinamico

marcatamente inferiori rispetto agli altri campioni, mostrano tracciati concordi ma caratterizzati da un significativo allargamento del segnale (Figura 65 c e Figura 65 d). Per la concentrazione 105 mg/mL (Figura 65 d), il primo e il terzo tracciato rivelano una popolazione bimodale, mentre il secondo tracciato mostra una terza popolazione a diametro inferiore a 1 nm.

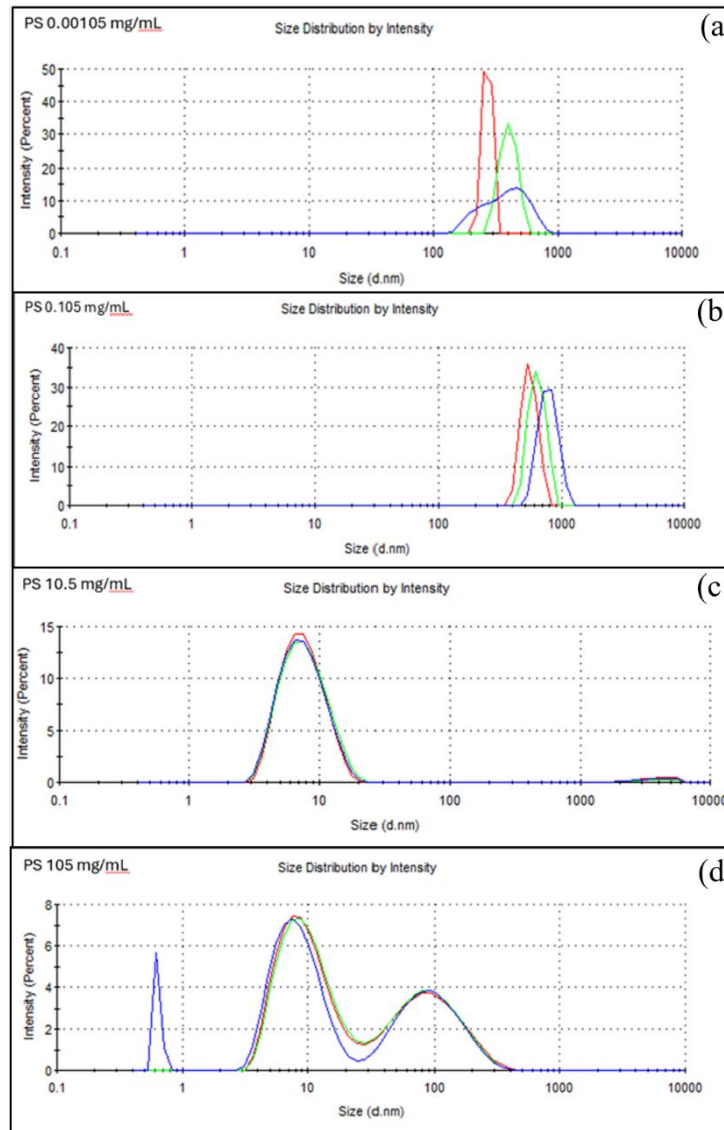


Figura 65. Triplicato della misura di diametro idrodinamico della sospensione di PS 0.00105 mg/mL (a), 0.105 mg/mL (b), 10.5 mg/mL (c) e 105 mg/mL (d).

Le anomalie riscontrate nella determinazione della dimensione delle particelle hanno reso necessaria, anche in questo caso, un'analisi morfologica mediante microscopia elettronica, per valutare la corrispondenza tra il diametro reale e quello certificato delle MP commerciali, e per valutarne l'effettivo carattere monodisperso.

Come in precedenza effettuato per il PE, sono state condotte ulteriori analisi DLS ed LDE in funzione di pH. Inoltre, sono state effettuate delle misure in funzione della temperatura. Al fine di incrementare la riproducibilità, i parametri di acquisizione delle misurazioni sono stati modificati: il numero di *run* è stato aumentato da 20 (ciascuno della durata di 12 secondi) a 25 (da 100 secondi). Le misure sono state eseguite su campioni di PS aventi concentrazione pari a 0.105 mg/mL, ovvero la concentrazione minima consigliata dal manuale dello Zetasizer Nano per particelle caratterizzate da un diametro pari a 1 μm .

Per le analisi in funzione del pH sono state esclusi i valori agli estremi pari 1 e 13, in quanto, come riscontrato con le sospensioni di PE, presentano una conduttività molto elevata che costituisce un limite operativo per lo strumento, che riesce comunque a riportare un valore medio di potenziale Zeta. Il numero di campioni è stato incrementato, introducendo sospensioni con pH pari a 2, 4, 6, 8, 10 e 12. I risultati ottenuti sono riportati in Tabella 12.

Tabella 12. Risultati delle analisi delle sospensioni di PS a 0.105 mg/mL in funzione del pH.

pH	Size (nm)	Pdl	Zeta (mV)	cond. (mS/cm)
2.09	1235±27	0.245±0.006	1.2±0.2	3.1±0.2
3.27	1302±48	0.05±0.02	-12.2±0.3	0.375±0.006
4.12	1215±29	0.14±0.02	-14.2±0.4	0.124±0.001
5.17	1076±11	0.09±0.02	-20.3±0.1	0.0689
6.24	1144±61	0.081±0.006	-32±1	0.0728
7.02	1149±44	0.06±0.04	-8.1±0.3	0.258±0.007
8.17	1171±45	0.03±0.02	-6.3±0.1	0.247±0.005
9.33	1030±105	0.07±0.06	-20±2	0.105±0.002
10.04	1163±32	0.03±0.02	-21±1	0.109±0.002
11.03	1054±77	0.1±0.1	-6.6±0.4	0.34±0.01
12.06	1122±21	0.1±0.1	-13±1	1.15±0.07

Tutti i campioni mostrano valori di diametro idrodinamico in accordo con la dimensione certificata, sebbene soltanto il sistema a pH 6.24 esibisca una stabilità ottimale, le misure dimensionali sugli altri campioni non sono influenzate dall'instabilità del sistema. Il Pdl prossimo allo zero si rivela coerente con la distribuzione monodispersa dei campioni. A pH 2.06 (Figura 66), il potenziale Zeta positivo e vicino al valore nullo, può essere indice del fatto che il mezzo di dispersione si trovi al di sotto del punto di zero carica del polistirene. Si osserva anche come l'ottimizzazione dei parametri di acquisizione (numero di *run*, tempo di acquisizione) abbia permesso di ottenere deviazioni standard nettamente più contenute.

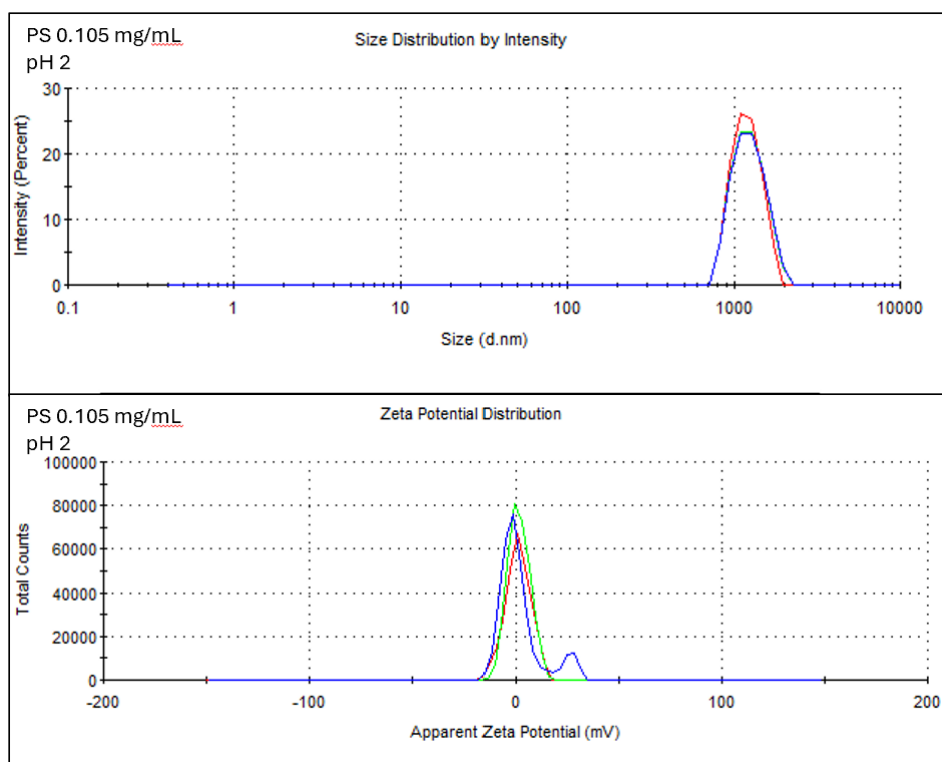


Figura 66. Triplicato della misura di diametro idrodinamico (in alto) e di potenziale Zeta (in basso) della sospensione di PS 0.105 mg/mL a pH 2.

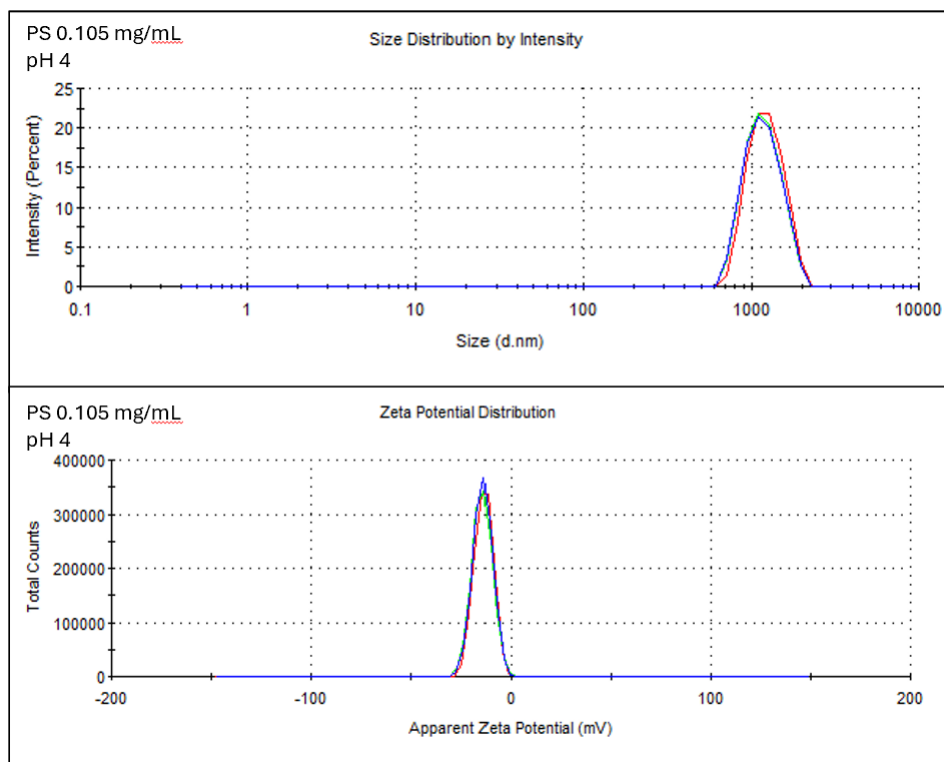


Figura 67. Triplicato della misura di diametro idrodinamico (in alto) e di potenziale Zeta (in basso) della sospensione di PS 0.105 mg/mL a pH 4.

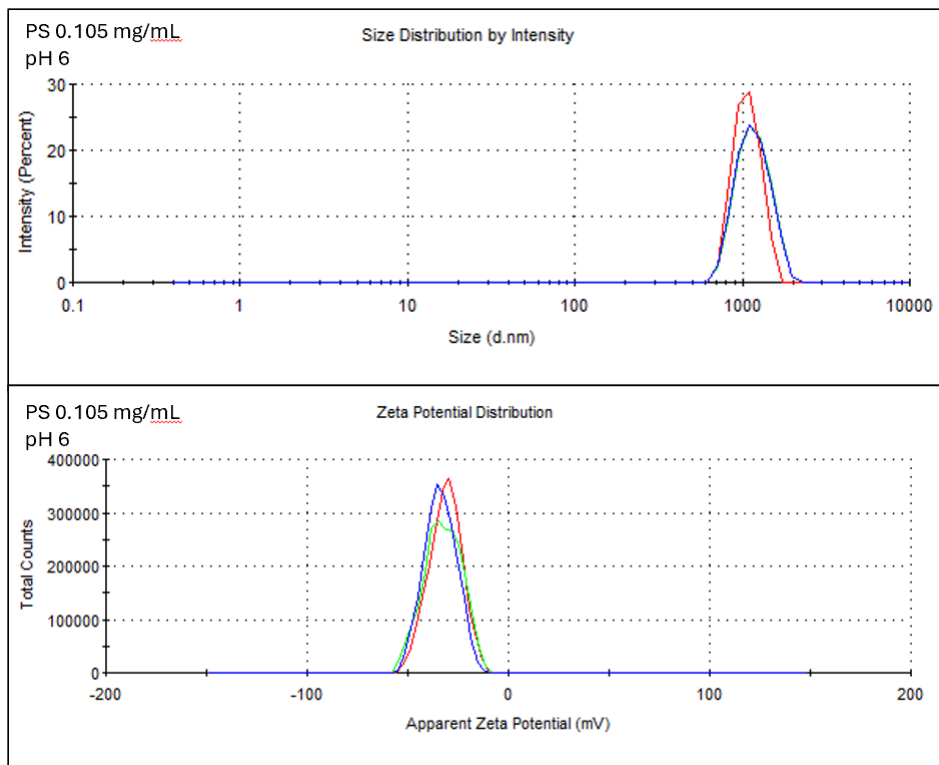


Figura 68. Triplicato della misura di diametro idrodinamico (in alto) e di potenziale Zeta (in basso) della sospensione di PS 0.105 mg/mL a pH 6.

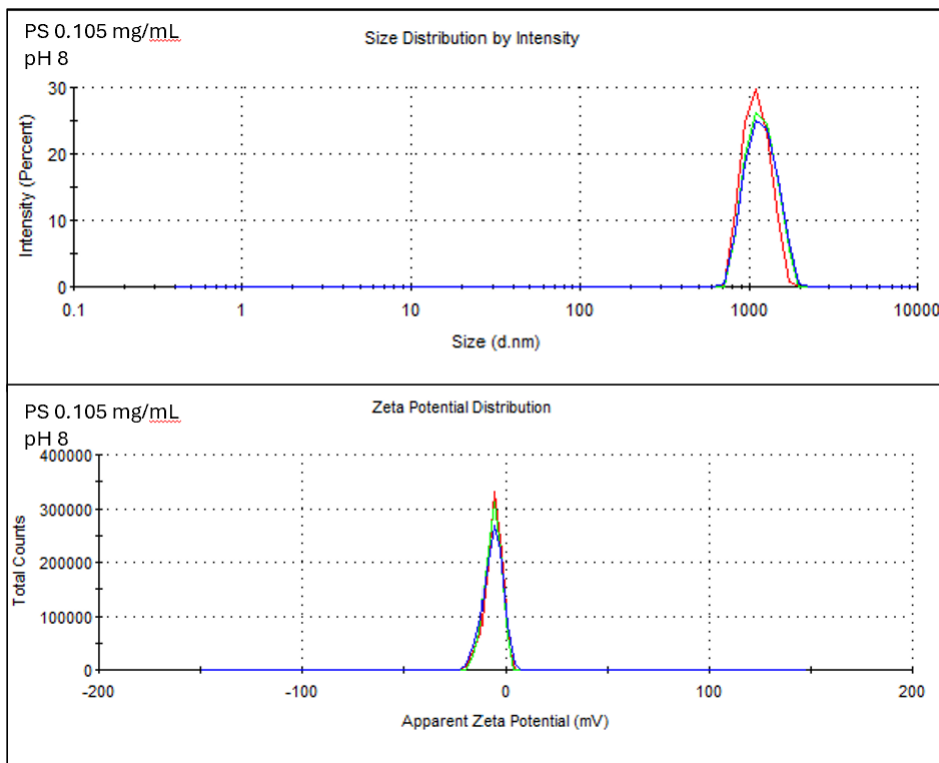


Figura 69. Triplicato della misura di diametro idrodinamico (in alto) e di potenziale Zeta (in basso) della sospensione di PS 0.105 mg/mL a pH 8.

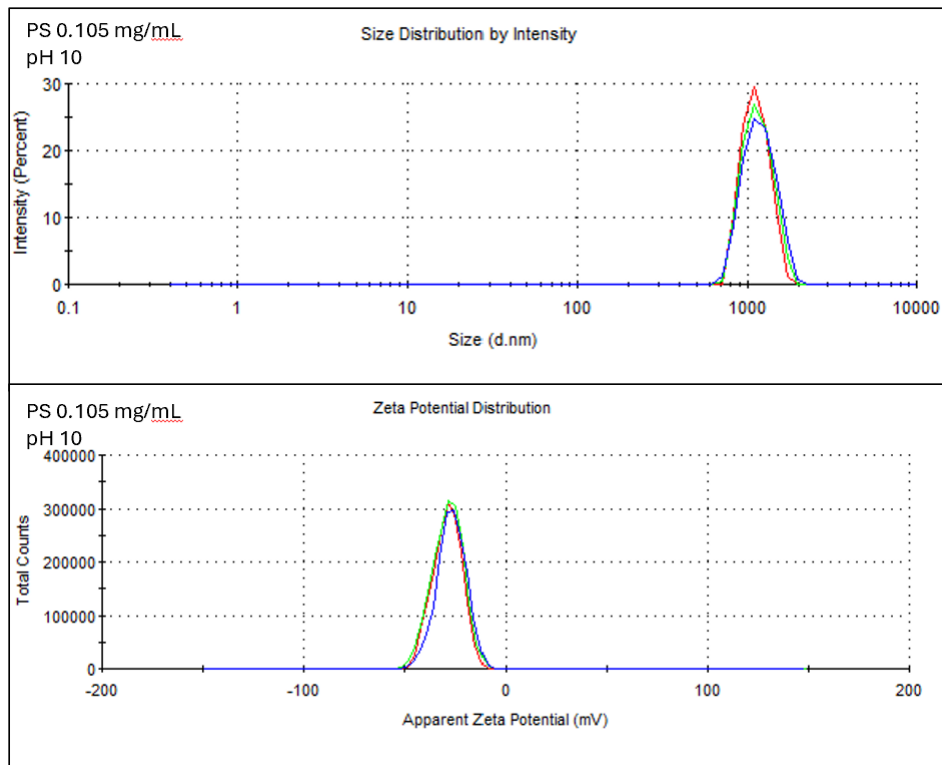


Figura 70. Triplicato della misura di diametro idrodinamico (in alto) e di potenziale Zeta (in basso) della sospensione di PS 0.105 mg/mL a pH 10.

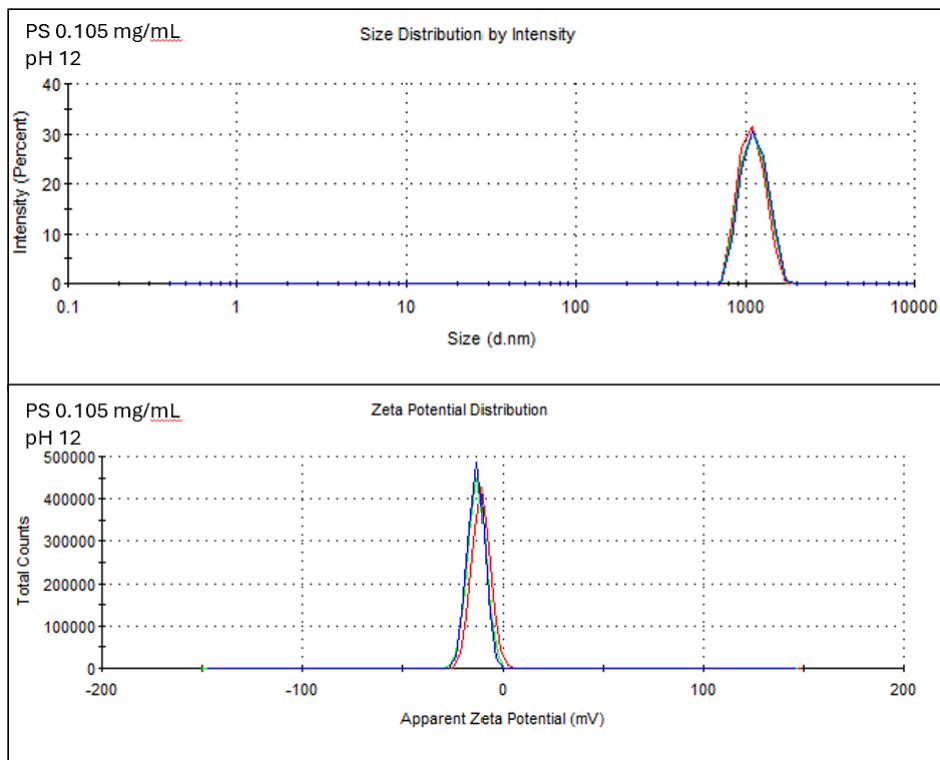


Figura 71. Triplicato della misura di diametro idrodinamico (in alto) e di potenziale Zeta (in basso) della sospensione di PS 0.105 mg/mL a pH 12.

Dai grafici di entrambe le misure si evince un'ottima riproducibilità delle analisi, con i tre tracciati che risultano sufficientemente sovrapponibili e concordi tra loro. Al variare del pH, a fronte di una variazione moderata del diametro idrodinamico, il potenziale Zeta oscilla sensibilmente tra condizioni di moderata instabilità (circa -20 mV) e forte instabilità (circa -10 mV), intorno all'unico valore stabilizzante registrato a pH 6. Anche in questo caso, come per il PE, è stato intuito il punto di carica zero, a cui è avvenuta l'inversione di carica. Si nota, infine, una netta discrepanza con i valori di diametro idrodinamico precedentemente ottenuti in acqua deionizzata, i quali risultavano sistematicamente inferiori alla dimensione reale delle particelle.

Infine è stata svolta l'analisi della sospensione a 0.105 mg/mL in funzione della temperatura. I risultati sono riportati in Tabella 13.

Tabella 13. Risultati delle analisi delle sospensioni di PS a 0.105 mg/mL in funzione della temperatura.

T (°C)	Size (nm)	Pdl	Zeta (mV)	cond. (mS/cm)
5	1093±22	0.09±0.05	-55.4±0.6	0.004
10	1098±19	0.06±0.03	-51.3±0.6	0.01±0.01
15	1035±2	0.08±0.01	-43.5±0.5	0.01±0.01
20	1055±13	0.09±0.02	-44.8±0.5	0.00381
25	1050±26	0.08±0.03	-43.1±0.7	0.00635

L'analisi in funzione della temperatura ha evidenziato come, sebbene non si notino importanti variazioni nel diametro idrodinamico, al diminuire della temperatura la sospensione risulti più stabile. Tale comportamento può essere verosimilmente correlato alla lieve riduzione dell'energia cinetica del sistema che si traduce in un moto Browniano meno intenso. Inoltre, analizzando i grafici, si nota come anche in queste misure i tracciati di ogni replica siano altamente concordi e riproducibili (Figura 72 e Figura 73).

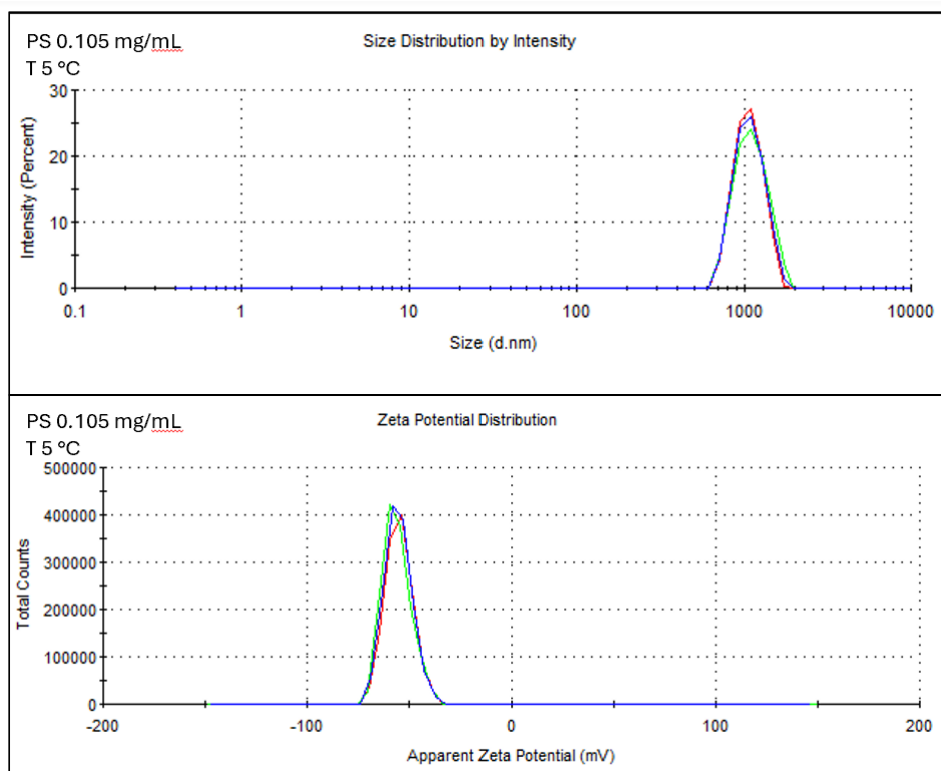


Figura 72. Triplicato della misura di diametro idrodinamico (in alto) e di potenziale Zeta (in basso) della sospensione di PS 0.105 mg/mL a 5 °C.

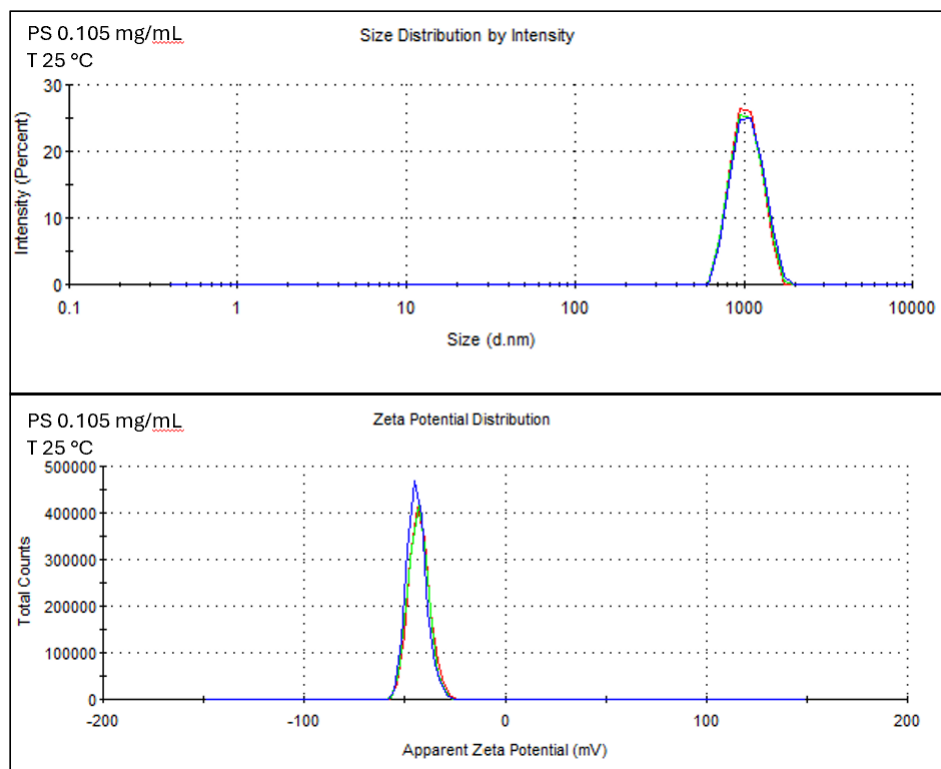


Figura 73. Triplicato della misura di diametro idrodinamico (in alto) e di potenziale Zeta (in basso) della sospensione di PS 0.105 mg/mL a 25 °C.

Dalle misure si evince che il potenziale Zeta vari in funzione della temperatura, raggiungendo a 5 °C un valore pari a -55 mV, indice di una forte stabilità del sistema colloidale.

Dati i valori di potenziale Zeta e di diametro idrodinamico coerenti tra loro nelle diverse condizioni testate, si può concludere che le particelle monodisperse e vendute già stabili in solvente siano ottimali per le misure DLS ed LDE. Questo risulta in contrasto con la natura eterogenea e polidispersa dei campioni reali; inoltre, la presenza di eventuali coloranti potrebbe comportare diverse interazioni con il fascio laser, restituendo fenomeni di assorbimento e di *scattering* differenti rispetto alle particelle incolori.

4.2.2 *Analisi dimensionale con la microscopia elettronica*

Attraverso la caratterizzazione SEM è stato possibile valutare la morfologia delle microplastiche standard di polietilene e polistirene utilizzate ed effettuare eventuali correlazioni con le anomalie riscontrate nelle misure DLS discusse nel Paragrafo 4.2.1. Il diametro delle particelle è stato misurato mediante l'impiego del *software* ImageJ, selezionando 20 particelle per immagine.

Le immagini SEM delle particelle di PE, ottenute raccogliendo il segnale proveniente dagli elettroni secondari, sono riportate in Figura 74 (ingrandimento 13500x). L'analisi ha permesso innanzitutto di osservarne la non perfetta sfericità delle microplastiche di riferimento, particolarmente evidente nell'immagine 74 b, in cui sono state indicate con le frecce due particelle visibilmente allungate. L'immagine 74 a non mostra microplastiche con un diametro al di fuori dell'intervallo dimensionale dichiarato del produttore (1-4 μm); al contrario, nella figura b), è evidenziata con un cerchio una particella con una dimensione di 7 μm .

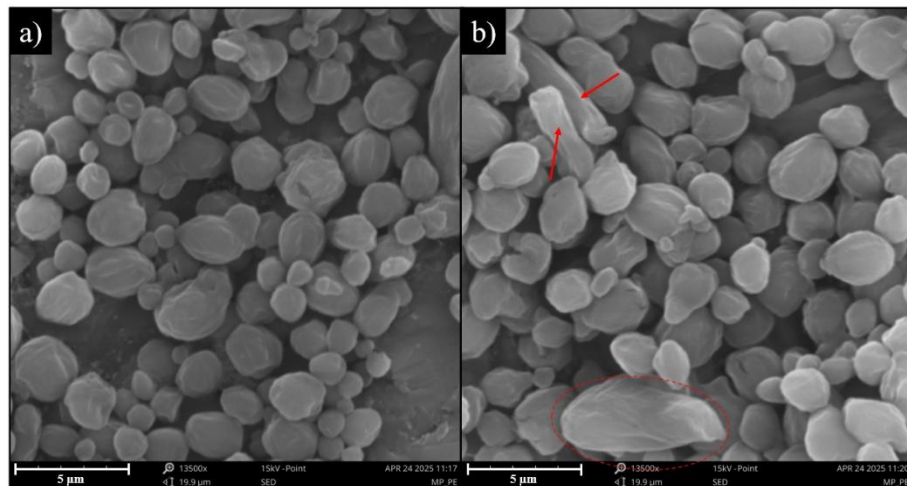


Figura 74. Analisi morfologica SEM delle microplastiche di PE standard (segmento unitario = 5 µm).

La non perfetta sfericità delle particelle rappresenta uno dei limiti principali per la tecnica DLS insieme alla polidispersione dimensionale. Inoltre, la riscontrata presenza di popolazioni aventi un diametro maggiore rispetto all'intervallo certificato rende più complicata l'interpretazione dei valori di diametro idrodinamico ottenuti precedentemente. Il diametro idrodinamico di una particella non sferica corrisponde al raggio di una sfera perfetta che ha uguale velocità. Perciò, la forma di una particella influenza la velocità e di conseguenza la dimensione idrodinamica. Per tale motivo, le anomalie riscontrate nelle misure DLS possono essere il riflesso della marcata eterogeneità nel campione di PE.

Le immagini delle particelle di PS sono riportate in Figura 75. Al contrario di quanto osservato per il PE, sia l'analisi della soluzione madre di microplastiche, (Figura 75 a) sia lo studio delle microplastiche disperse in H₂O (Figura 75 b) dimostrano la perfetta sfericità delle particelle, la congruenza del diametro con il valore certificato, pari a 1 µm, e l'uniformità dimensionale del campione standard.

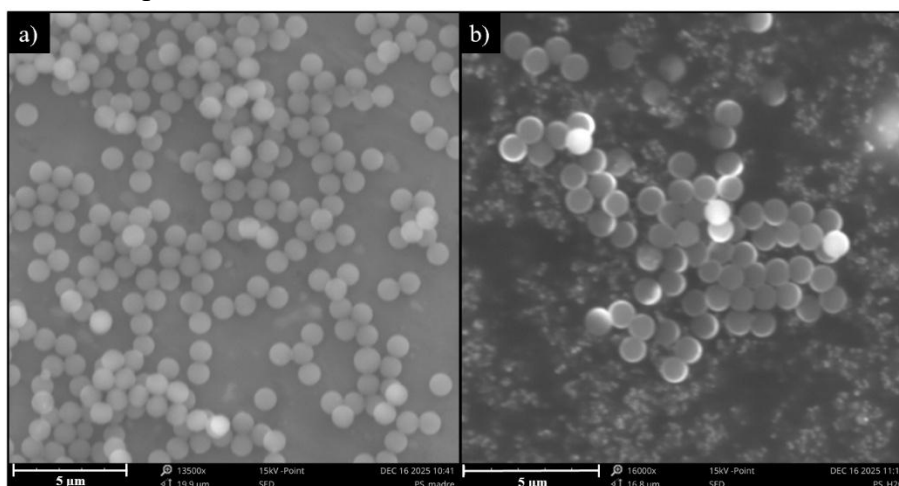


Figura 75. Analisi morfologica SEM delle microplastiche di PS standard a) nella soluzione madre e b) in H₂O (segmento unitario = 5 µm).

Le particelle di PS risultano ottimali per le misure DLS, le quali, infatti, risultano essere ampiamente riproducibili. Questo accade perché l'interazione con il laser avviene in condizioni ottimali; quando si verificano discostamenti dalla sfericità delle particelle e nella loro distribuzione dimensionale, il DLS non risulta più idoneo, come verificato per le particelle di PE. Tuttavia, non è possibile attribuire le anomalie osservate durante l'analisi DLS del PS in funzione della concentrazione a un discostamento delle MP standard dalle caratteristiche certificate: risulta dunque ancora da definire una possibile spiegazione che giustifichi i risultati riportati in Tabella 11.

Sono state svolte ulteriori analisi sulle microsfele di PS disperse in HNO_3 e in KOH 0.1M, per valutare eventuali cambiamenti morfologici dovuti all'ambiente acido (Figura 76 a) o basico (Figura 76 b): a tal fine, le soluzioni di particelle sono state depositate sui substrati per l'analisi SEM e analizzate a seguito dell'evaporazione del solvente. In entrambi i campioni si riscontrano zone in cui si sono formate possibili coalescenze tra le MP (indicate dalle frecce in Figura 76).

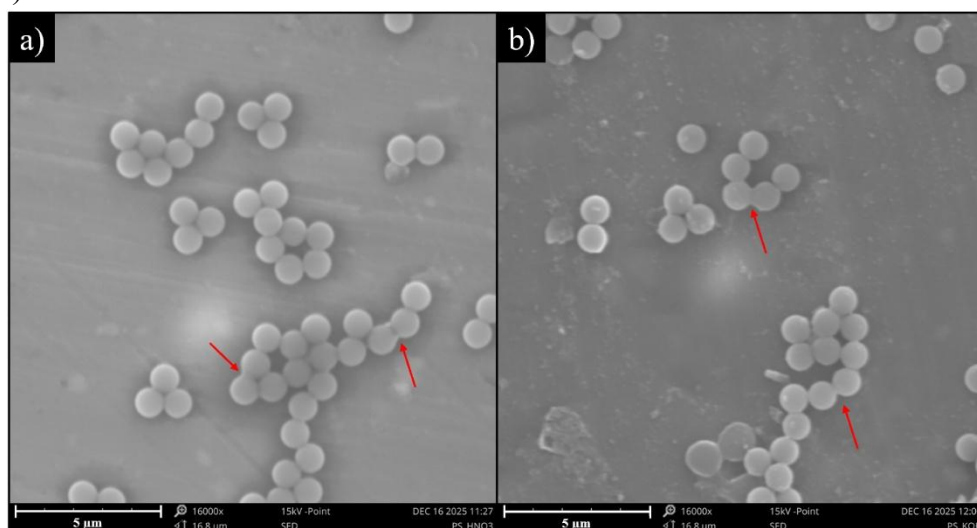


Figura 76. Analisi morfologica SEM delle microplastiche di PS standard a) in HNO_3 e b) in KOH (segmento unitario = 5 μm).

Le condizioni di pH impiegate non hanno alterato le particelle, se non in qualche caso di coalescenza e possibile aggregazione; questo fenomeno potrebbe essere correlato al valore medio del diametro idrodinamico maggiore a pH 2, 3 e 4 (Tabella 12). Tuttavia, tale variazione non viene riscontrata nei campioni a pH più basico, questo può indicare che il PS sia stabile in soluzioni di KOH . La stabilità del PS in KOH permette di escludere che i protocolli di digestione alcalina applicati ai campioni reali (descritti nel Paragrafo 2.4.2) alterino l'integrità di tali particelle. Pertanto, eventuali microplastiche di polistirene presenti nella matrice non subiscono fenomeni di degradazione indotti dal reagente e risulta possibile l'identificazione spettrale del polimero nelle condizioni originarie.

5 CONCLUSIONI

L'attività di ricerca presentata ha perseguito un duplice obiettivo: da un lato, l'identificazione di microplastiche all'interno di campioni di interesse clinico, con contestuale valutazione del supporto ottimale per la loro analisi mediante spettroscopia μ -Raman; dall'altro, la caratterizzazione delle microplastiche di polietilene e polistirene standard certificate sospese in matrici acquose a diversa composizione.

Il μ -Raman si è concentrato sulla ricerca di MP e di loro additivi all'interno di 16 campioni di fluido da dialisi peritoneale e di 2 campioni di esalato condensato. Lo studio spettroscopico ha permesso di:

- Evidenziare l'importanza della scelta di un substrato adeguato all'analisi, specifico per ciascuna tipologia di campione. La selezione deve comprendere una preliminare valutazione dei segnali Raman-attivi che caratterizzano ciascun supporto analitico, per evitare che questi possano coprire i segnali del campione. Un esempio è dato dalla membrana in silicio analizzata come possibile supporto per i campioni di condensato dell'aria espirata, che presentava un fondo spettrale particolarmente intenso, che potrebbe mascherare i segnali del polimero, ostacolando l'identificazione delle microparticelle. Inoltre, l'analisi preventiva dei supporti permette di regolare i parametri sperimentali, in modo da prevenire il danneggiamento del campione durante la fase di analisi; ad esempio, in questo studio è stato constatato come, per le membrane in PES, fosse necessario ridurre la potenza del laser, a causa di un'instabilità del supporto che, degradandosi, avrebbe anche degradato il campione.
- Mettere in luce due importanti evidenze per quanto riguarda l'aspetto della prevenzione della contaminazione secondaria. Il ritrovamento di fibre di cellulosa nei campioni di fluidi da dialisi filtrati al di fuori dalla cappa a flusso laminare ha sottolineato la necessità di impiegare quest'ultima in tutte le fasi di preparazione del campione. Inoltre, l'identificazione di frammenti di polipropilene nei campioni di EBC, verosimilmente derivanti dallo stesso dispositivo di raccolta, evidenzia l'importanza di analizzare un bianco procedurale per tale matrice, in modo tale da quantificare la contaminazione data dal sistema di campionamento.
- Ottenere un riscontro positivo per la ricerca di MP sia all'interno di fluidi da dialisi, sia in campioni di condensato dell'aria espirata. Oltre a MP vere e proprie, le analisi μ -Raman hanno permesso di identificare all'interno dei campioni anche pigmenti ampiamente impiegati nella colorazione di materiali plastici, tra cui il blu di ftalocianina, la cui presenza all'interno dell'organismo è già stata documentata da [1] e [69], e un colorante della famiglia degli azoici [115].

In futuro, lo studio sui campioni da dialisi sarà esteso anche agli effluenti peritoneali, ossia i fluidi in uscita dal paziente in fase di trattamento. Lo scopo è quello di eseguire un confronto tra le microplastiche e gli additivi presenti nelle soluzioni in entrata e in quelle in uscita, per determinare la quantità di eventuali particelle rimosse dall'organismo del paziente.

Tale indagine non è stata inclusa nello studio poiché richiede una specifica approvazione del comitato etico, non conclusa nei tempi di svolgimento della tesi e ancora in fase di richiesta.

Per quanto riguarda i campioni di condensato dell'aria espirata, in futuro sarà necessario aumentare il numero di campioni, includendo anche quelli raccolti da volontari sani, in modo da poter valutare la possibile correlazione tra la presenza di microplastiche nei campioni e la presenza di malattie respiratorie croniche.

La parte dello studio rivolta all'analisi di microplastiche standard mediante tecniche DLS e SEM ha permesso di valutarne le proprietà, quali diametro idrodinamico, potenziale Zeta, dimensione e dispersione dimensionale. Al contempo sono stati messi in luce alcuni dei limiti operativi delle tecniche:

- Le analisi condotte sul polietilene hanno evidenziato come l'instabilità delle sospensioni acquose, sia a concentrazione che a pH variabile, si rifletta sulla determinazione del corretto diametro idrodinamico, comportando una perdita di riproducibilità e la comparsa di artefatti strumentali. La coesistenza di molteplici criticità rende complessa l'attribuzione di una singola causa alle anomalie riscontrate. La morfologia delle particelle, valutata mediante microscopia elettronica, ha portato alla luce la non sfericità delle particelle commerciali, la loro polidispersione e la presenza, anche ridotta, di frazioni dimensionali al di fuori dell'intervallo dichiarato, aspetti che rendono questo specifico campione inadeguato per le analisi DLS. Nonostante ciò, è stato possibile verificare che incrementando la concentrazione polimerica a 0.25 mg/mL, in un intervallo di pH tra 5 e 11, la stabilità del sistema (con valori di potenziale Zeta compresi tra -57 mV e -75 mV) permette di ottenere tracciati concordi e coerenti con le dimensioni del polimero. Quando la sospensione risulta instabile, in particolare in prossimità del punto di carica zero, le particelle precipitano e il laser non è più in grado di interagire con esse, generando grafici di diametro idrodinamico che possono essere interpretati erroneamente.
- Lo studio dello standard di polistirene ha permesso di considerare l'effetto dell'uniformità dimensionale e della sfericità delle particelle, caratteristiche indagate anche attraverso la microscopia elettronica. Modificando opportunamente i parametri di acquisizione, è stato possibile ridurre le deviazioni standard e ottenere misure altamente riproducibili, con risultati di diametro idrodinamico allineati al valore certificato della dimensione. Per queste MP è stato quindi possibile stimare l'influenza del pH e della temperatura sul potenziale Zeta e sul diametro idrodinamico. La sospensione ha mostrato instabilità a quasi tutti i valori di pH studiati, dimostrandosi stabile unicamente a pH 6; nonostante ciò, i valori di diametro idrodinamico non hanno mostrato anomalie. Una bassa temperatura (5 °C) stabilizza fortemente il campione, verosimilmente a causa della ridotta energia cinetica delle particelle, migliorandone il risultato strumentale. La coerenza dei risultati ottenuti nelle diverse condizioni testate permette di considerare questo standard ottimale per le misure DLS ed LDE.

- È stato possibile verificare come elevati valori della conduttività del mezzo, così come sospensioni di microplastiche eccessivamente diluite o eccessivamente concentrate, rappresentino un limite importante per l'utilizzo dello strumento. Le deviazioni dai parametri ideali di misura impediscono la raccolta del segnale o possono causare una interpretazione inesatta del dato ottenuto. Tuttavia, per delineare un protocollo di analisi al DLS completo, sono necessarie ulteriori analisi che considerino ulteriori casistiche, per poter altresì rappresentare con maggiore precisione le potenzialità e i limiti di queste tecniche analitiche in relazione a questa tipologia di campioni, specialmente in matrici reali.

In conclusione, l'insieme delle evidenze sperimentali ha permesso di affermare che le tecniche DLS ed LDE non risultano idonee per l'analisi di microplastiche all'interno di campioni reali e in matrici particolarmente complesse. Infatti, il software dello strumento basa i calcoli sull'assunzione ideale che le particelle siano sfere perfette e monodisperse, mentre le MP riscontrate all'interno dei campioni reali si discostano drasticamente da questo modello. In aggiunta, gli elevati valori di forza ionica e conduttività tipici delle matrici biologiche reali complicano ulteriormente l'analisi, che potrebbe restituire risultati errati, generati dalla rilevazione di eventuali popolazioni fittizie.

Il lavoro di tesi ha confermato l'efficacia della spettroscopia micro-Raman nell'identificazione di microplastiche e additivi in campioni reali, dimostrando la contaminazione di due tipologie di matrici di spiccato interesse clinico. Inoltre, lo studio ha permesso di definire indicazioni fondamentali per le indagini future: da un lato, è risultata centrale la selezione preventiva di un substrato ideale per la caratterizzazione spettroscopica; dall'altro, è stata rimarcata la necessità di adottare misure per prevenire la contaminazione secondaria, evidenziando l'utilità dell'impiego sistematico della cappa a flusso laminare.

6 BIBLIOGRAFIA

- [1] S. Massardo *et al.*, «MicroRaman spectroscopy detects the presence of microplastics in human urine and kidney tissue», *Environment International*, vol. 184, p. 108444, feb. 2024, doi: 10.1016/j.envint.2024.108444.
- [2] M. C. C. Andreoli e C. Totoli, «Peritoneal Dialysis», *Rev. Assoc. Med. Bras.*, vol. 66, fasc. suppl 1, pp. s37–s44, 2020, doi: 10.1590/1806-9282.66.s1.37.
- [3] «Plastics - the Facts 2019 • Plastics Europe», Plastics Europe. [Online]. Disponibile su: <https://plasticseurope.org/knowledge-hub/plastics-the-facts-2019/>
- [4] P. G. C. Nayanathara Thathsarani Pilapitiya e A. S. Ratnayake, «The world of plastic waste: A review», *Cleaner Materials*, vol. 11, p. 100220, mar. 2024, doi: 10.1016/j.clema.2024.100220.
- [5] «Plastikatlas | Heinrich-Böll-Stiftung». Consultato: 14 aprile 2026. [Online]. Disponibile su: <https://www.boell.de/de/plastikatlas>
- [6] I. E. Napper e R. C. Thompson, «Plastics and the Environment», *Annu. Rev. Environ. Resour.*, vol. 48, fasc. 1, pp. 55–79, nov. 2023, doi: 10.1146/annurev-environ-112522-072642.
- [7] D. Kwon, «Three ways to solve the plastics pollution crisis», *Nature*, vol. 616, fasc. 7956, pp. 234–237, apr. 2023, doi: 10.1038/d41586-023-00975-5.
- [8] G. Pathak *et al.*, «Plastic pollution and the open burning of plastic wastes», *Global Environmental Change*, vol. 80, p. 102648, mag. 2023, doi: 10.1016/j.gloenvcha.2023.102648.
- [9] N. Reyna-Bensusan, D. C. Wilson, P. M. Davy, G. W. Fuller, G. D. Fowler, e S. R. Smith, «Experimental measurements of black carbon emission factors to estimate the global impact of uncontrolled burning of waste», *Atmospheric Environment*, vol. 213, pp. 629–639, set. 2019, doi: 10.1016/j.atmosenv.2019.06.047.
- [10] O. Adetona, O. B. Ozoh, T. Oluseyi, Q. Uzoegwu, J. Odei, e M. Lucas, «An exploratory evaluation of the potential pulmonary, neurological and other health effects of chronic exposure to emissions from municipal solid waste fires at a large dumpsite in Olusosun, Lagos, Nigeria», *Environ Sci Pollut Res*, vol. 27, fasc. 24, pp. 30885–30892, ago. 2020, doi: 10.1007/s11356-020-09701-4.
- [11] N. Kováts *et al.*, «Ecotoxic emissions generated by illegal burning of household waste», *Chemosphere*, vol. 298, p. 134263, lug. 2022, doi: 10.1016/j.chemosphere.2022.134263.
- [12] R. Verma, K. S. Vinoda, M. Papireddy, e A. N. S. Gowda, «Toxic Pollutants from Plastic Waste- A Review», *Procedia Environmental Sciences*, vol. 35, pp. 701–708, 2016, doi: 10.1016/j.proenv.2016.07.069.
- [13] T. Thiounn e R. C. Smith, «Advances and approaches for chemical recycling of plastic waste», *Journal of Polymer Science*, vol. 58, fasc. 10, pp. 1347–1364, mag. 2020, doi: 10.1002/pol.20190261.
- [14] I. A. Ignatyev, W. Thielemans, e B. Vander Beke, «Recycling of Polymers: A Review», *ChemSusChem*, vol. 7, fasc. 6, pp. 1579–1593, giu. 2014, doi: 10.1002/cssc.201300898.
- [15] G. Maitlo *et al.*, «Plastic Waste Recycling, Applications, and Future Prospects for a Sustainable Environment», *Sustainability*, vol. 14, fasc. 18, p. 11637, set. 2022, doi: 10.3390/su141811637.
- [16] S. Chen e Y. H. Hu, «Advancements and future directions in waste plastics recycling: From mechanical methods to innovative chemical processes», *Chemical Engineering Journal*, vol. 493, p. 152727, ago. 2024, doi: 10.1016/j.cej.2024.152727.
- [17] S. C. Gall e R. C. Thompson, «The impact of debris on marine life», *Marine Pollution Bulletin*, vol. 92, fasc. 1–2, pp. 170–179, mar. 2015, doi: 10.1016/j.marpolbul.2014.12.041.
- [18] P.-O. Maquart, Y. Froehlich, e S. Boyer, «Plastic pollution and infectious diseases», *The Lancet Planetary Health*, vol. 6, fasc. 10, pp. e842–e845, ott. 2022, doi: 10.1016/S2542-5196(22)00198-X.

- [19] A. L. Andrady, «Persistence of Plastic Litter in the Oceans», in *Marine Anthropogenic Litter*, M. Bergmann, L. Gutow, e M. Klages, A c. di, Cham: Springer International Publishing, 2015, pp. 57–72. doi: 10.1007/978-3-319-16510-3_3.
- [20] Y. K. Song, S. H. Hong, M. Jang, G. M. Han, S. W. Jung, e W. J. Shim, «Combined Effects of UV Exposure Duration and Mechanical Abrasion on Microplastic Fragmentation by Polymer Type», *Environ. Sci. Technol.*, vol. 51, fasc. 8, pp. 4368–4376, apr. 2017, doi: 10.1021/acs.est.6b06155.
- [21] L. Xie, M. Ma, Q. Ge, Y. Liu, e L. Zhang, «Machine Learning Advancements and Strategies in Microplastic and Nanoplastic Detection», *Environ. Sci. Technol.*, vol. 59, fasc. 18, pp. 8885–8899, mag. 2025, doi: 10.1021/acs.est.4c11888.
- [22] E. J. Carpenter, S. J. Anderson, G. R. Harvey, H. P. Miklas, e B. B. Peck, «Polystyrene Spherules in Coastal Waters», *Science*, vol. 178, fasc. 4062, pp. 749–750, nov. 1972, doi: 10.1126/science.178.4062.749.
- [23] J. B. Colton, B. R. Burns, e F. D. Knapp, «Plastic Particles in Surface Waters of the Northwestern Atlantic: The abundance, distribution, source, and significance of various types of plastics are discussed.», *Science*, vol. 185, fasc. 4150, pp. 491–497, ago. 1974, doi: 10.1126/science.185.4150.491.
- [24] R. C. Thompson *et al.*, «Lost at Sea: Where Is All the Plastic?», *Science*, vol. 304, fasc. 5672, pp. 838–838, mag. 2004, doi: 10.1126/science.1094559.
- [25] J. Song, C. Wang, e G. Li, «Defining Primary and Secondary Microplastics: A Connotation Analysis», *ACS EST Water*, vol. 4, fasc. 6, pp. 2330–2332, giu. 2024, doi: 10.1021/acsestwater.4c00316.
- [26] L. S. Fendall e M. A. Sewell, «Contributing to marine pollution by washing your face: Microplastics in facial cleansers», *Marine Pollution Bulletin*, vol. 58, fasc. 8, pp. 1225–1228, ago. 2009, doi: 10.1016/j.marpolbul.2009.04.025.
- [27] S. Acharya, S. S. Rumi, Y. Hu, e N. Abidi, «Microfibers from synthetic textiles as a major source of microplastics in the environment: A review», *Textile Research Journal*, vol. 91, fasc. 17–18, pp. 2136–2156, set. 2021, doi: 10.1177/0040517521991244.
- [28] N. Rafa *et al.*, «Microplastics as carriers of toxic pollutants: Source, transport, and toxicological effects», *Environmental Pollution*, vol. 343, p. 123190, feb. 2024, doi: 10.1016/j.envpol.2023.123190.
- [29] F. G. Torres, D. C. Dioses-Salinas, C. I. Pizarro-Ortega, e G. E. De-la-Torre, «Sorption of chemical contaminants on degradable and non-degradable microplastics: Recent progress and research trends», *Science of The Total Environment*, vol. 757, p. 143875, feb. 2021, doi: 10.1016/j.scitotenv.2020.143875.
- [30] R. M. Razanajatovo, J. Ding, S. Zhang, H. Jiang, e H. Zou, «Sorption and desorption of selected pharmaceuticals by polyethylene microplastics», *Marine Pollution Bulletin*, vol. 136, pp. 516–523, nov. 2018, doi: 10.1016/j.marpolbul.2018.09.048.
- [31] L. A. Holmes, A. Turner, e R. C. Thompson, «Adsorption of trace metals to plastic resin pellets in the marine environment», *Environmental Pollution*, vol. 160, pp. 42–48, gen. 2012, doi: 10.1016/j.envpol.2011.08.052.
- [32] P. S. Tourinho, V. Kočí, S. Loureiro, e C. A. M. Van Gestel, «Partitioning of chemical contaminants to microplastics: Sorption mechanisms, environmental distribution and effects on toxicity and bioaccumulation», *Environmental Pollution*, vol. 252, pp. 1246–1256, set. 2019, doi: 10.1016/j.envpol.2019.06.030.
- [33] J. P. Greene, «Microstructures of Polymers», in *Automotive Plastics and Composites*, Elsevier, 2021, pp. 27–37. doi: 10.1016/B978-0-12-818008-2.00009-X.
- [34] A. Bakir, S. J. Rowland, e R. C. Thompson, «Competitive sorption of persistent organic pollutants onto microplastics in the marine environment», *Marine Pollution Bulletin*, vol. 64, fasc. 12, pp. 2782–2789, dic. 2012, doi: 10.1016/j.marpolbul.2012.09.010.
- [35] T. Hüffer e T. Hofmann, «Sorption of non-polar organic compounds by micro-sized plastic particles in aqueous solution», *Environmental Pollution*, vol. 214, pp. 194–201, lug. 2016, doi: 10.1016/j.envpol.2016.04.018.
- [36] J. Li, K. Zhang, e H. Zhang, «Adsorption of antibiotics on microplastics», *Environmental Pollution*, vol. 237, pp. 460–467, giu. 2018, doi: 10.1016/j.envpol.2018.02.050.

- [37] N. B. Hartmann *et al.*, «Microplastics as vectors for environmental contaminants: Exploring sorption, desorption, and transfer to biota», *Integrated Environmental Assessment and Management*, vol. 13, fasc. 3, pp. 488–493, mag. 2017, doi: 10.1002/ieam.1904.
- [38] Z. Xu *et al.*, «Complex release dynamics of microplastic additives: An interplay of additive degradation and microplastic aging», *Journal of Hazardous Materials*, vol. 490, p. 137711, giu. 2025, doi: 10.1016/j.jhazmat.2025.137711.
- [39] X. Dong *et al.*, «Seasonal biofilm formation on floating microplastics in coastal waters of intensified mariculture area», *Marine Pollution Bulletin*, vol. 171, p. 112914, ott. 2021, doi: 10.1016/j.marpolbul.2021.112914.
- [40] M. Fabra, L. Williams, J. E. M. Watts, M. S. Hale, F. Couceiro, e J. Preston, «The plastic Trojan horse: Biofilms increase microplastic uptake in marine filter feeders impacting microbial transfer and organism health», *Science of The Total Environment*, vol. 797, p. 149217, nov. 2021, doi: 10.1016/j.scitotenv.2021.149217.
- [41] C. Li *et al.*, «Pelagic microplastics in surface water of the Eastern Indian Ocean during monsoon transition period: Abundance, distribution, and characteristics», *Science of The Total Environment*, vol. 755, p. 142629, feb. 2021, doi: 10.1016/j.scitotenv.2020.142629.
- [42] L. D. K. Kanhai, R. Officer, O. Lyashevskaya, R. C. Thompson, e I. O'Connor, «Microplastic abundance, distribution and composition along a latitudinal gradient in the Atlantic Ocean», *Marine Pollution Bulletin*, vol. 115, fasc. 1–2, pp. 307–314, feb. 2017, doi: 10.1016/j.marpolbul.2016.12.025.
- [43] G. A. De Lucia *et al.*, «Amount and distribution of neustonic micro-plastic off the western Sardinian coast (Central-Western Mediterranean Sea)», *Marine Environmental Research*, vol. 100, pp. 10–16, set. 2014, doi: 10.1016/j.marenvres.2014.03.017.
- [44] S. Ziajahromi, P. A. Neale, L. Rintoul, e F. D. L. Leusch, «Wastewater treatment plants as a pathway for microplastics: Development of a new approach to sample wastewater-based microplastics», *Water Research*, vol. 112, pp. 93–99, apr. 2017, doi: 10.1016/j.watres.2017.01.042.
- [45] Z. Akdogan, B. Guven, e A. E. Kideys, «Microplastic distribution in the surface water and sediment of the Ergene River», *Environmental Research*, vol. 234, p. 116500, ott. 2023, doi: 10.1016/j.envres.2023.116500.
- [46] M. Wagner *et al.*, «Microplastics in freshwater ecosystems: what we know and what we need to know», *Environ Sci Eur*, vol. 26, fasc. 1, p. 12, dic. 2014, doi: 10.1186/s12302-014-0012-7.
- [47] M. González-Pleiter *et al.*, «First detection of microplastics in the freshwater of an Antarctic Specially Protected Area», *Marine Pollution Bulletin*, vol. 161, p. 111811, dic. 2020, doi: 10.1016/j.marpolbul.2020.111811.
- [48] C. L. Waller *et al.*, «Microplastics in the Antarctic marine system: An emerging area of research», *Science of The Total Environment*, vol. 598, pp. 220–227, nov. 2017, doi: 10.1016/j.scitotenv.2017.03.283.
- [49] J. Gago, O. Carretero, A. V. Filgueiras, e L. Viñas, «Synthetic microfibers in the marine environment: A review on their occurrence in seawater and sediments», *Marine Pollution Bulletin*, vol. 127, pp. 365–376, feb. 2018, doi: 10.1016/j.marpolbul.2017.11.070.
- [50] M. Bläsing e W. Amelung, «Plastics in soil: Analytical methods and possible sources», *Science of The Total Environment*, vol. 612, pp. 422–435, gen. 2018, doi: 10.1016/j.scitotenv.2017.08.086.
- [51] G. Chen, Q. Feng, e J. Wang, «Mini-review of microplastics in the atmosphere and their risks to humans», *Science of The Total Environment*, vol. 703, p. 135504, feb. 2020, doi: 10.1016/j.scitotenv.2019.135504.
- [52] P. K. Rose, M. Jain, N. Kataria, P. K. Sahoo, V. K. Garg, e A. Yadav, «Microplastics in multimedia environment: A systematic review on its fate, transport, quantification, health risk, and remedial measures», *Groundwater for Sustainable Development*, vol. 20, p. 100889, feb. 2023, doi: 10.1016/j.gsd.2022.100889.

- [53] E. Kılıç, «Microplastic ingestion evidence by economically important farmed fish species from Turkey», *Marine Pollution Bulletin*, vol. 183, p. 114097, ott. 2022, doi: 10.1016/j.marpolbul.2022.114097.
- [54] H. Li *et al.*, «Detection of microplastics in domestic and fetal pigs' lung tissue in natural environment: A preliminary study», *Environmental Research*, vol. 216, p. 114623, gen. 2023, doi: 10.1016/j.envres.2022.114623.
- [55] N. Beriot, J. Peek, R. Zornoza, V. Geissen, e E. Huerta Lwanga, «Low density-microplastics detected in sheep faeces and soil: A case study from the intensive vegetable farming in Southeast Spain», *Science of The Total Environment*, vol. 755, p. 142653, feb. 2021, doi: 10.1016/j.scitotenv.2020.142653.
- [56] E. Thrift, A. Porter, T. S. Galloway, F. G. Coomber, e F. Mathews, «Ingestion of plastics by terrestrial small mammals», *Science of The Total Environment*, vol. 842, p. 156679, ott. 2022, doi: 10.1016/j.scitotenv.2022.156679.
- [57] J. Vleeming, S. N. J. Laan, e T. Bosker, «Uptake and translocation of polystyrene nanoplastics in edible plants via root and foliar exposure: A qualitative imaging-based study», *Environmental Pollution*, vol. 390, p. 127516, feb. 2026, doi: 10.1016/j.envpol.2025.127516.
- [58] K. H. D. Tang, «A review of the toxic effects of microplastics based on studies on mammals and mammalian cell lines», *Environ. Sci.: Adv.*, vol. 3, fasc. 12, pp. 1669–1678, 2024, doi: 10.1039/D4VA00227J.
- [59] C. Dessì *et al.*, «Plastics contamination of store-bought rice», *Journal of Hazardous Materials*, vol. 416, p. 125778, ago. 2021, doi: 10.1016/j.jhazmat.2021.125778.
- [60] C. Vitali, R. J. B. Peters, H.-G. Janssen, e M. W. F. Nielen, «Microplastics and nanoplastics in food, water, and beverages; part I. occurrence», *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, vol. 159, p. 116670, feb. 2023, doi: 10.1016/j.trac.2022.116670.
- [61] X. Zhang *et al.*, «Effects of thermal exposure to disposable plastic tableware on human gut microbiota and metabolites: A quasi-experimental study», *Journal of Hazardous Materials*, vol. 462, p. 132800, gen. 2024, doi: 10.1016/j.jhazmat.2023.132800.
- [62] Z. Liao *et al.*, «Airborne microplastics in indoor and outdoor environments of a coastal city in Eastern China», *Journal of Hazardous Materials*, vol. 417, p. 126007, set. 2021, doi: 10.1016/j.jhazmat.2021.126007.
- [63] Q. Zhang, Y. Zhao, F. Du, H. Cai, G. Wang, e H. Shi, «Microplastic Fallout in Different Indoor Environments», *Environ. Sci. Technol.*, vol. 54, fasc. 11, pp. 6530–6539, giu. 2020, doi: 10.1021/acs.est.0c00087.
- [64] P. McLean, E. A. Christopher, A. Sleuwenhoek, M. Lofty, K. Dixon, e K. S. Galea, «Dermal exposure, review of current knowledge on the uptake of micro-and nanoplastics», *Micropl. & Nanopl.*, vol. 6, fasc. 1, p. 12, dic. 2025, doi: 10.1186/s43591-025-00163-4.
- [65] B. Zhao, P. Rehati, Z. Yang, Z. Cai, C. Guo, e Y. Li, «The potential toxicity of microplastics on human health», *Science of The Total Environment*, vol. 912, p. 168946, feb. 2024, doi: 10.1016/j.scitotenv.2023.168946.
- [66] D.-W. Lee *et al.*, «Microplastic particles in human blood and their association with coagulation markers», *Sci Rep*, vol. 14, fasc. 1, p. 30419, dic. 2024, doi: 10.1038/s41598-024-81931-9.
- [67] H. A. Leslie, M. J. M. Van Velzen, S. H. Brandsma, A. D. Vethaak, J. J. Garcia-Vallejo, e M. H. Lamoree, «Discovery and quantification of plastic particle pollution in human blood», *Environment International*, vol. 163, p. 107199, mag. 2022, doi: 10.1016/j.envint.2022.107199.
- [68] S. Liu *et al.*, «The Association Between Microplastics and Microbiota in Placentas and Meconium: The First Evidence in Humans», *Environ. Sci. Technol.*, vol. 57, fasc. 46, pp. 17774–17785, nov. 2023, doi: 10.1021/acs.est.2c04706.
- [69] A. Ragusa *et al.*, «Plasticenta: First evidence of microplastics in human placenta», *Environment International*, vol. 146, p. 106274, gen. 2021, doi: 10.1016/j.envint.2020.106274.

- [70] M. Cetin *et al.*, «Higher number of microplastics in tumoral colon tissues from patients with colorectal adenocarcinoma», *Environ Chem Lett*, vol. 21, fasc. 2, pp. 639–646, apr. 2023, doi: 10.1007/s10311-022-01560-4.
- [71] L. C. Jenner, J. M. Rotchell, R. T. Bennett, M. Cowen, V. Tentzeris, e L. R. Sadofsky, «Detection of microplastics in human lung tissue using μ FTIR spectroscopy», *Science of The Total Environment*, vol. 831, p. 154907, lug. 2022, doi: 10.1016/j.scitotenv.2022.154907.
- [72] L. F. Amato-Lourenço, R. Carvalho-Oliveira, G. R. Júnior, L. Dos Santos Galvão, R. A. Ando, e T. Mauad, «Presence of airborne microplastics in human lung tissue», *Journal of Hazardous Materials*, vol. 416, p. 126124, ago. 2021, doi: 10.1016/j.jhazmat.2021.126124.
- [73] A. Ragusa *et al.*, «Raman Microspectroscopy Detection and Characterisation of Microplastics in Human Breastmilk», *Polymers*, vol. 14, fasc. 13, p. 2700, giu. 2022, doi: 10.3390/polym14132700.
- [74] L. Montano *et al.*, «Raman Microspectroscopy evidence of microplastics in human semen», *Science of The Total Environment*, vol. 901, p. 165922, nov. 2023, doi: 10.1016/j.scitotenv.2023.165922.
- [75] T. Horvatits *et al.*, «Microplastics detected in cirrhotic liver tissue», *eBioMedicine*, vol. 82, p. 104147, ago. 2022, doi: 10.1016/j.ebiom.2022.104147.
- [76] C. Pironti, V. Notarstefano, M. Ricciardi, O. Motta, E. Giorgini, e L. Montano, «First Evidence of Microplastics in Human Urine, a Preliminary Study of Intake in the Human Body», *Toxics*, vol. 11, fasc. 1, p. 40, dic. 2022, doi: 10.3390/toxics11010040.
- [77] S. Primpke *et al.*, «Critical Assessment of Analytical Methods for the Harmonized and Cost-Efficient Analysis of Microplastics», *Appl Spectrosc*, vol. 74, fasc. 9, pp. 1012–1047, set. 2020, doi: 10.1177/0003702820921465.
- [78] A. L. Khan e A. A. Zaidi, «Separation and Detection of Microplastics in Human Exposure Pathways: Challenges, Analytical Techniques, and Emerging Solutions», *JoX*, vol. 15, fasc. 5, p. 154, set. 2025, doi: 10.3390/jox15050154.
- [79] G. Malafaia e D. Barceló, «Microplastics in human samples: Recent advances, hot-spots, and analytical challenges», *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, vol. 161, p. 117016, apr. 2023, doi: 10.1016/j.trac.2023.117016.
- [80] A. T. Wibowo *et al.*, «Microplastic Contamination in the Human Gastrointestinal Tract and Daily Consumables Associated with an Indonesian Farming Community», *Sustainability*, vol. 13, fasc. 22, p. 12840, nov. 2021, doi: 10.3390/su132212840.
- [81] Z. Yan *et al.*, «An efficient method for extracting microplastics from feces of different species», *Journal of Hazardous Materials*, vol. 384, p. 121489, feb. 2020, doi: 10.1016/j.jhazmat.2019.121489.
- [82] C. Yu Chen, M. Olshammar, G. Thorsén, e E. Strömberg, «Identification and quantification techniques for microplastics: strengths, weaknesses, and recommendations for harmonisation», dic. 2024.
- [83] M. Cai *et al.*, «Current status and emerging techniques for sampling, separating, and identifying microplastics in freshwater environments», *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, vol. 184, p. 118151, mar. 2025, doi: 10.1016/j.trac.2025.118151.
- [84] S. Gündoğdu *et al.*, «Microplastics in soil: a comprehensive review of analytical techniques», *Front. Soil Sci.*, vol. 5, p. 1614075, lug. 2025, doi: 10.3389/fsoil.2025.1614075.
- [85] B. Ren, Y. Meng, X. Yang, Y. Chen, e G. Liu, «Microplastics sampling methods and standardization requirements in atmospheric environment—a critical review», *Air Qual Atmos Health*, vol. 19, fasc. 2, p. 26, feb. 2026, doi: 10.1007/s11869-026-01886-w.
- [86] D. Barceló, Y. Picó, e A. H. Alfarhan, «Microplastics: Detection in human samples, cell line studies, and health impacts», *Environmental Toxicology and Pharmacology*, vol. 101, p. 104204, ago. 2023, doi: 10.1016/j.etap.2023.104204.
- [87] C. Di Fiore, Y. Ishikawa, e S. L. Wright, «A review on methods for extracting and quantifying microplastic in biological tissues», *Journal of Hazardous Materials*, vol. 464, p. 132991, feb. 2024, doi: 10.1016/j.jhazmat.2023.132991.

- [88] R. R. Hurley, A. L. Lusher, M. Olsen, e L. Nizzetto, «Validation of a Method for Extracting Microplastics from Complex, Organic-Rich, Environmental Matrices», *Environ. Sci. Technol.*, vol. 52, fasc. 13, pp. 7409–7417, lug. 2018, doi: 10.1021/acs.est.8b01517.
- [89] A. Karami, A. Golieskardi, C. K. Choo, N. Romano, Y. B. Ho, e B. Salamatinia, «A high-performance protocol for extraction of microplastics in fish», *Science of The Total Environment*, vol. 578, pp. 485–494, feb. 2017, doi: 10.1016/j.scitotenv.2016.10.213.
- [90] M. Rani *et al.*, «A Complete Guide to Extraction Methods of Microplastics from Complex Environmental Matrices», *Molecules*, vol. 28, fasc. 15, p. 5710, lug. 2023, doi: 10.3390/molecules28155710.
- [91] C. Baeza-Martínez *et al.*, «First evidence of microplastics isolated in European citizens' lower airway», *Journal of Hazardous Materials*, vol. 438, p. 129439, set. 2022, doi: 10.1016/j.jhazmat.2022.129439.
- [92] Y. S. Ibrahim *et al.*, «Detection of microplastics in human colectomy specimens», *JGH Open*, vol. 5, fasc. 1, pp. 116–121, gen. 2021, doi: 10.1002/jgh3.12457.
- [93] J. V. Miller, J. R. Maskrey, K. Chan, e K. M. Unice, «Pyrolysis-Gas Chromatography-Mass Spectrometry (Py-GC-MS) Quantification of Tire and Road Wear Particles (TRWP) in Environmental Matrices: Assessing the Importance of Microstructure in Instrument Calibration Protocols», *Analytical Letters*, vol. 55, fasc. 6, pp. 1004–1016, apr. 2022, doi: 10.1080/00032719.2021.1979994.
- [94] C. Roman *et al.*, «Effect of size continuum from nanoplastics to microplastics on marine mussel *Mytilus edulis*: Comparison in vitro/in vivo exposure scenarios», *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology*, vol. 264, p. 109512, feb. 2023, doi: 10.1016/j.cbpc.2022.109512.
- [95] T. Ren, L. Yan, D. Wang, N. Xu, W. Zhang, e M. Yang, «In vivo biotoxicological assessment of nanoplastics and microplastics predicted using the zebrafish model», *PeerJ*, vol. 13, p. e19833, set. 2025, doi: 10.7717/peerj.19833.
- [96] Z. Chen, Z. Hua, e P. Guo, «The bioaccumulation and ecotoxicity of co-exposure of per(poly)fluoroalkyl substances and polystyrene microplastics to *Eichhornia crassipes*», *Water Research*, vol. 260, p. 121878, ago. 2024, doi: 10.1016/j.watres.2024.121878.
- [97] O. Baş *et al.*, «To what extent are orally ingested nanoplastics toxic to the hippocampus in young adult rats?», *Journal of Chemical Neuroanatomy*, vol. 132, p. 102314, ott. 2023, doi: 10.1016/j.jchemneu.2023.102314.
- [98] Z. Liu e X. You, «Recent progress of microplastic toxicity on human exposure base on in vitro and in vivo studies», *Science of The Total Environment*, vol. 903, p. 166766, dic. 2023, doi: 10.1016/j.scitotenv.2023.166766.
- [99] Z. Lin *et al.*, «Current progress on plastic/microplastic degradation: Fact influences and mechanism», *Environmental Pollution*, vol. 304, p. 119159, lug. 2022, doi: 10.1016/j.envpol.2022.119159.
- [100] Z. Kilinc *et al.*, «Photodegradation of polystyrene microplastics exposed to natural sunlight», *Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry*, vol. 468, p. 116462, nov. 2025, doi: 10.1016/j.jphotochem.2025.116462.
- [101] E. Hermsen, S. M. Mintenig, E. Besseling, e A. A. Koelmans, «Quality Criteria for the Analysis of Microplastic in Biota Samples: A Critical Review», *Environ. Sci. Technol.*, vol. 52, fasc. 18, pp. 10230–10240, set. 2018, doi: 10.1021/acs.est.8b01611.
- [102] I. Zanoni *et al.*, «Characterization of polyethylene and polyurethane microplastics and their adsorption behavior on Cu²⁺ and Fe³⁺ in environmental matrices», *Environ Sci Eur*, vol. 37, fasc. 1, p. 21, feb. 2025, doi: 10.1186/s12302-025-01061-5.
- [103] S. Lazzari, D. Moscatelli, F. Codari, M. Salmona, M. Morbidelli, e L. Diomede, «Colloidal stability of polymeric nanoparticles in biological fluids», *J Nanopart Res*, vol. 14, fasc. 6, p. 920, giu. 2012, doi: 10.1007/s11051-012-0920-7.
- [104] A. M. N. A. Abdul Rahman *et al.*, «Surface interactions of model microplastic particles in seawater», *Progress in Rubber, Plastics and Recycling Technology*, vol. 39, fasc. 1, pp. 3–11, feb. 2023, doi: 10.1177/14777606221128043.

- [105] A. C. Sabuncu, J. Grubbs, S. Qian, T. M. Abdel-Fattah, M. W. Stacey, e A. Beskok, «Probing nanoparticle interactions in cell culture media», *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, vol. 95, pp. 96–102, giu. 2012, doi: 10.1016/j.colsurfb.2012.02.022.
- [106] S. Bhattacharjee, «DLS and zeta potential – What they are and what they are not?», *Journal of Controlled Release*, vol. 235, pp. 337–351, ago. 2016, doi: 10.1016/j.jconrel.2016.06.017.
- [107] E. Dzierżyński *et al.*, «Post-mortem evidence of microplastic bioaccumulation in human organs: insights from advanced imaging and spectroscopic analysis», *Arch Toxicol*, vol. 99, fasc. 10, pp. 4051–4066, ott. 2025, doi: 10.1007/s00204-025-04092-2.
- [108] «Turbo DECCS System», Medivac. [Online]. Disponibile su: <https://www.medivac.it/it/turbo-deccs-systems/>
- [109] K. Munno, H. De Frond, B. O'Donnell, e C. M. Rochman, «Increasing the Accessibility for Characterizing Microplastics: Introducing New Application-Based and Spectral Libraries of Plastic Particles (SLoPP and SLoPP-E)», *Anal. Chem.*, vol. 92, fasc. 3, pp. 2443–2451, feb. 2020, doi: 10.1021/acs.analchem.9b03626.
- [110] «IRUG Spectral Database», IRUG Infrared & Raman Users Group. [Online]. Disponibile su: <http://www.irug.org/>
- [111] M. Santostefano, *SpeComp*. PM TEN srl, Piazza della Vittoria 7/14, 16121, Genoa, Italy. [Online]. Disponibile su: <https://github.com/serafino1911/SpeComp.git>
- [112] M. F. Maitz, «Applications of synthetic polymers in clinical medicine», *Biosurface and Biotribology*, vol. 1, fasc. 3, pp. 161–176, set. 2015, doi: 10.1016/j.bsbt.2015.08.002.
- [113] «Determinazione ftalati in una membrana: Microscopia Raman», ABCS.
- [114] F. Akoueson *et al.*, «Identification of plastic additives: Py/TD-GC-HRMS method development and application on food containers», *Journal of Analytical and Applied Pyrolysis*, vol. 168, p. 105745, nov. 2022, doi: 10.1016/j.jaap.2022.105745.
- [115] «The Complete Guide to Azo Dyes and Azo Dyes Test», HQTs. [Online]. Disponibile su: <https://www.hqts.com/azo-dye-test-a-guide-to-the-compliance-for-importers/>
- [116] «Applicazione di pigmenti organici in materie plastiche e resine», Zeya Chemicals. [Online]. Disponibile su: <https://it.zeyachem.net/application-organic-pigments-plastics-resins.html>